

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



TESIS DOCTORAL

Aproximación a un sistema de vigilancia molecular de *Leishmania infantum* y sus vectores

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ivonne Pamela Llanes Acevedo

Director

Israel Cruz Mata

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



TESIS DOCTORAL

**Aproximación a un sistema de vigilancia molecular
de *Leishmania infantum* y sus vectores**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR:

Ivonne Pamela Llanes Acevedo

Director:

Dr. Israel Cruz Mata

Instituto de Salud Carlos III

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



**Aproximación a un sistema de vigilancia molecular
de *Leishmania infantum* y sus vectores**

Tesis Doctoral

IVONNE PAMELA LLANES ACEVEDO



Madrid, 2017

D. Israel Cruz Mata, Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, científico titular de OPIs en la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. Y actualmente en excedencia en la *Foundation for Innovative New Diagnostics*, Ginebra, Suiza.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Aproximación a un sistema de vigilancia molecular de *Leishmania infantum* y sus vectores”** presentado por la licenciada Ivonne Pamela Llanes Acevedo, ha sido realizado en el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, 20 de abril de 2017

VºBº Director



Dr. Israel Cruz Mata

La interesada

Ivonne Pamela Llanes Acevedo

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible en parte gracias a la financiación de los siguientes organismos:

- Beca predoctoral del Programa de Crédito beca para posgrados en el exterior “Colciencias- Colfuturo”.

Entidad financiadora: “Colciencias-Colfuturo”, Ministerio de Educación Nacional, República de Colombia.

Duración: Noviembre 2012 - Septiembre 2014.
Beneficiario, 2012.

- Contrato asociado al proyecto *EU-Brazil Cloud Infrastructure Connecting Federated Resources for Scientific Advancement* (EuBrazilCC). European Commission, FP7-614048.

Entidad financiadora: Comisión Europea

Duración: Febrero 2015-Agosto 2016

Investigador Principal: Israel Cruz Mata

Coordinador General: Ignacio Blanquer

A mi madre, a quien le debo tanto.
A Fede, con todo mi amor y sincera gratitud.

AGRADECIMIENTOS

Con estas líneas pretendo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que durante estos años de trabajo han estado a mi lado, amigos, familia y compañeros, y que de una u otra forma han contribuido a que esta tesis haya llegado a buen fin.

Al Dr. Israel Cruz por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y por haberme facilitado los medios para llevar a cabo las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Por su disponibilidad, para la cual sus siempre puntuales sugerencias resultaron de vital importancia para dar forma a los resultados finales.

A Carolina Arcones y Emi García, ya que sin su colaboración en las labores técnicas este trabajo no habría sido posible, gracias también por ser excelentes compañera con la que he podido contar en todo momento.

Mi gratitud y más sincero cariño al Dr. Javier Moreno, por tener siempre la puerta abierta para resolver dudas, y solucionar todo tipo de problemas que han surgido en el desarrollo de este trabajo. Por su gran calidad humana, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. David Carmena por el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas, por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada.

A la Dra. Carmen Chicharro, que ha seguido de cerca el desarrollo de la presente tesis, quisiera agradecerle por su ayuda en muchas de las tareas realizadas. Gracias por la lectura del borrador, las acertadas recomendaciones y críticas, siempre desde una perspectiva positiva y constructiva, permitieron que se mejorara esta memoria. También me gustaría agradecer la ayuda recibida de la Dra. Aurora Fernández, del Dr. Miguel Thomson, y del Dr. Juan quienes resolvieron muchas de mis inquietudes en filogenia.

Al grupo de investigación Epicontrol- cánvoros del Departamento de sanidad Animal (UCM), por su inestimable colaboración científica en parte de los trabajos realizados en la presente Tesis.

Así como al resto de compañeros de grupo, Javier, Eugenia, Sheila, Silvia, Lauri, Laurita, Ana, a todo mi grupo, con los que he compartido gran parte de mi trabajo, les agradezco toda la ayuda que me han prestado, así como los buenos momentos compartidos. A Susana por su amistad e incondicionalidad, a Cristina, Gaby, Bruno, Marta, algunos de las cuales ya han emprendido otros caminos y con quienes he compartido muchos momentos de estos años, gracias por hacer que las risas acompañaran nuestro trabajo diario.

A todo el servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología, por haber hecho posible mi formación como doctoranda, en especial a la Dra. Teresa Gárate y a la Dra. Isabel de Fuentes por estar siempre dispuestas a ayudarme tanto en el ámbito profesional como personal, ¡les estoy muy agradecida por el afecto recibido!

Al grupo de compañeros de la Universidad de Bari, quienes me hicieron vivir una experiencia única en el doctorado, una estancia corta pero sustanciosa, gracias por acogerme durante un mes en la bella Italia, gracias a Viviana Tarallo, por todas tus enseñanzas sobre flebotomos.

Por supuesto, gracias a mi madre, por darme la vida, quererme mucho y creer en mí. Ha sido ella quien me ha inculcado desde niña el amor al estudio y quien me enseñó a luchar para alcanzar mis metas. Gracias mami, tu esmero y sacrificios siempre han valido la pena, espero que te sientas orgullosa, porque por ti he llegado hasta aquí!

Gracias al resto de mi familia quienes a pesar de la distancia han sabido darme el cariño y apoyo moral, mostrado siempre su afecto e interés. Gracias a mis hermano/as y a Nico “la alegría de la familia”, espero que, si algún día lees esto, sepas que fuiste uno de mis estímulos durante este tiempo. Gracias a mis amigos de aquí y allá, los que siempre han creído en mí y me han tenido presente a pesar de no tenerme cerca.

Pero sin duda alguna, mi mayor agradecimiento se lo debo a mi esposo. Gracias, Fede, porque esta Tesis es tan tuya como mía, ya que, sin ti, jamás hubiera sido posible llegar a la meta. Tú eres la persona que mejor me conoce y sabe lo gratificante que ha sido para mí el culminar este trabajo. Mil gracias por compartir tu vida conmigo, por tu apoyo y por toda la paciencia que me has tenido. Tú me has sostenido en mis peores momentos, tú has sido mi cómplice, mi amigo en las buenas y en las malas. Pero sobre todo, gracias por darme el amor más incondicional que alguien puede dar!

Por último, pero no menos importante, a Dios. Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud, la fe y la esperanza para lograr mis objetivos, a quien debo y agradezco todo lo que soy y todo lo que tengo.

Muchas gracias a tod@s!

ABREVIATURAS

A	Base Adenina
a. a	aminoácido
A₂₆₀, A₂₈₀	Absorbancia a 260 y 280 nanómetros, respectivamente
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNm	Genoma mitocondrial
BLAST	Herramienta para alineamientos (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
C	Base Citosina
°C	Grados centígrados
CAM	Comunidad Autónoma de Madrid
CDS	Secuencia de ADN codificante (<i>Coding DNA Sequence</i>)
cm²	Centímetros cuadrados
COI	Citocromo Oxidasa subunidad 1
CNM	Centro Nacional de Microbiología
[C]	Concentración
CYTB	Citocromo Oxidasa b
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido EtilenDiaminoTetraAcético
EEUU	Estados Unidos
G	Base Guanina
g	gramos
h	Haplotipo
Hd	Diversidad haplotípica
Ha	Hectáreas
HASPB	Proteína de superficie hidrofílica acilada B (<i>hydrophilic acylated surface protein B</i>)
HSP70	HSP70 Proteína de choque térmico de 70 kDa
IB	Islas Baleares
ISCH	Instituto de Salud Carlos III
ITS	Espaciador transcrito interno (<i>Internal Transcribed Spacers</i>)
JC	Jukes Cantor
kDa	Kilodalton
K2P	Kimura 2 parámetros
LC	Leishmaniasis Cutánea
LL	Linfadenopatía localizada
LMC	Leishmaniasis Mucocutánea
LV	Leishmaniasis Visceral
m	metros
M	Molar
ML	Máxima Verosimilitud (<i>Maximum Likelihood</i>)
mg	miligramos
min	Minutos
MLEE	Análisis múltiple de enzimas mediante electroforesis (<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>)

MLSA	Tipado mediante el análisis de secuencias multilocus (<i>Multilocus Sequencing Analysis</i>)
MLMT	Tipado mediante análisis de microsatélites (<i>Multilocus Microsatellite Typing</i>)
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Método de programa informático - <i>Neighbor -joining</i>
NET-10	NaCl, EDTA, Tris-HCl
ng	nanogramos
NNN	Novy-McNeal-Nicolle
nm	Nanómetros
nt	nucleótidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-	Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción del producto
RFLP	amplificado mediante PCR
PI	Península Ibérica
RENAVE	Red Nacional de de Vigilancia Epidemiológica
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Sitios polimórficos
SBF1	Suero Bovino Fetal Inactivado
seg	Segundos
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIP	Sitios Informativos de Parsimonia
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
ST	Secuencia Tipo
T	Base Timina
TBE	Tampón Tris Borato EDTA
TI	Tasa de incidencia
trs	Transición
trv	Transversión
U	Unidad
UCM	Universidad Complutense de Madrid
UTR	Región de ADN no transcrita (<i>untranslated region</i>)
UV	Luz ultravioleta
V	Voltios
Vh	Voltios por hora
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
μl	Microlitro
μM	Micromolar

ÍNDICE

RESUMEN	- 1 -
ABSTRACT	- 5 -
I. INTRODUCCIÓN	- 9 -
1. GENERALIDADES	- 11 -
1.1. Distribución e impacto global	- 12 -
1.2. Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i>	- 13 -
1.3. Morfología del Parásito	- 16 -
1.4. Ciclo biológico	- 17 -
1.4.1. Vectores	- 18 -
1.4.1.1. Ciclo vital y hábitos	- 20 -
1.4.1.2. Criterios de incriminación como vector de la leishmaniasis	- 22 -
1.4.1.3. Flebótomos como vectores de la leishmaniasis en la cuenca mediterránea ...	- 22 -
1.4.2. Reservorios	- 25 -
1.4.3. Reservorios de <i>L. infantum</i> en la región mediterránea	- 25 -
1.4.3.1. El perro	- 25 -
1.4.3.1.1. Leishmaniasis canina: manifestaciones clínicas	- 27 -
1.4.3.2. Reservorios alternativos de <i>L. infantum</i>	- 28 -
1.5. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis humana	- 31 -
2. EMERGENCIA Y RE-EMERGENCIA DE LA LEISHMANIASIS EN EUROPA	- 34 -
3. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA LEISHMANIASIS HUMANA EN ESPAÑA	- 38 -
3.1. Brote de leishmaniasis humana en la Comunidad Autónoma de Madrid	- 41 -
4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIASIS	- 44 -
4.1. Caracterización fenotípica de <i>Leishmania</i> : electroforesis de enzimas multilocus	- 45 -
4.2. Caracterización genética de <i>Leishmania</i> spp.	- 46 -
4.2.1. El genoma de <i>Leishmania</i> spp.	- 46 -
4.2.2. Reproducción en <i>Leishmania</i>	- 48 -
4.2.3. Tipado molecular de <i>Leishmania</i>	- 48 -
4.3. Epidemiología molecular de la leishmaniasis	- 53 -
4.3.1. Aplicaciones de la biología molecular en la epidemiología de la Leishmaniasis ...	- 54 -
4.3.1.1. Investigación molecular en el vector	- 55 -
4.3.1.1.1. Identificación del origen de la fuente de sangre en los flebótomo	- 55 -
4.3.1.1.2. Detección de <i>Leishmania</i> en el vector	- 55 -
4.3.1.1.3. Identificación de especie de vector	- 56 -
4.3.1.1.4. Genética de poblaciones del vector	- 56 -
4.3.1.2. Investigación molecular en el parásito	- 57 -
4.3.1.2.1. Identificación de especie y variabilidad intraespecífica	- 57 -
4.3.1.2.2. Genética de poblaciones del parásito	- 58 -
4.3.1.3. Hacia un sistema integrado de vigilancia molecular	- 58 -
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	59

III. MATERIALES & MÉTODOS	63
ESQUEMA DE TRABAJO	65
1. Descripción de la muestra para los estudios en el parásito	67
1.1. Cepas de <i>Leishmania infantum</i>	67
1.2. Cepas de referencia	70
2. Condiciones de cultivo de <i>Leishmania</i> en medio Novy-McNeal-Nicolle (NNN)	71
2.1. Inoculación en medio de cultivo	71
2.2. Obtención de cultivos en masa para la colección	72
2.3. Condiciones de criopreservación de los aislados de <i>Leishmania</i>	72
2.4. Preparación de las cepas de <i>L. infantum</i> para la extracción de ADN	72
3. Descripción de la muestra para los estudios en el vector	73
3.1. Flebótomos	73
3.1.1. Área de estudio	73
3.1.2. Métodos de captura	74
3.1.3. Procesamiento del material entomológico e identificación morfológica	75
4. Obtención de ácidos nucleicos totales a partir de cultivos y de tejidos	76
4.1. Extracción de ADN genómico	76
4.1.1. Cuantificación del ADN	77
5. Técnicas de caracterización molecular	78
5.1. Técnicas de caracterización molecular en <i>L. infantum</i>	79
5.1.1. Identificación de especies de <i>Leishmania</i> mediante PCR ITS1	79
5.1.2. Amplificación de las regiones que contienen la ITS1 e ITS2	80
5.1.3. Amplificación y análisis de polimorfismo del gen <i>k26</i>	82
5.1.3.1. Análisis de la variabilidad aminoacídica del gen <i>k26</i>	83
5.1.3.2. Amplificación de los genes que componen el sistema de análisis multilocus (MLSA)	84
5.2. Técnicas de caracterización molecular en flebótomos	86
5.2.1. Amplificación del gen que codifica para la Citocromo oxidasa subunidad 1	86
5.2.2. Amplificación del gen que codifica para el Citocromo b	87
5.2.2.1. Digestión de los productos de amplificación del <i>cytb</i>	88
6. Detección y visualización de los productos de amplificación por PCR	88
6.1. Electroforesis en geles de agarosa	88
6.2. Electroforesis en chip o matriz fluorescente	89
7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	90
8. Secuenciación de los productos de PCR	91
8.1. Revisión, edición y alineamiento de secuencias de ADN	91
8.2. Análisis bioinformático de las secuencias de ADN	92
 CAPÍTULO 1: Tipado molecular de los aislados de <i>L. infantum</i> implicados en el brote de leishmaniasis en el suroeste de la Comunidad Autónoma de Madrid, España 2008-2012.	 95
1. ANTECEDENTES	97
2. MATERIALES Y MÉTODOS	98
2.1. Primer grupo: Aislados de la zona del brote y otras áreas de Madrid, 2008–2012.	98

2.2.	Segundo grupo: aislados de <i>L. infantum</i> zimodemas MON-1 y MON-24.	- 102 -
2.3.	Extracción de ADN.....	- 104 -
2.4.	Tipado molecular	- 104 -
2.5.	Análisis Filogenético	- 105 -
3.	RESULTADOS	- 106 -
3.1.	Análisis de las regiones ITS 1 e ITS 2	- 106 -
3.2.	Relaciones filogenéticas de las secuencias tipo ITS	- 107 -
3.3.	Genotipos combinados: ITS y k26.....	- 108 -
4.	DISCUSIÓN.....	- 112 -

CAPÍTULO 2: Caracterización molecular de cepas de *Leishmania infantum* aisladas de humanos, perros y flebótomos en España, 1986-2015 - 115 -

1.	ANTECEDENTES	- 117 -
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	- 118 -
2.1.	Aislados de <i>L. infantum</i>	- 118 -
2.2.	Extracción de ADN genómico a partir de muestras de cultivo	- 119 -
2.3.	Amplificación por PCR de las regiones ITS y el gen <i>k26</i>	- 121 -
2.4.	Purificación de los productos de PCR- K26.....	- 121 -
2.5.	Secuenciación de ADN.....	- 122 -
2.6.	Análisis filogenético de las regiones ITS.....	- 122 -
2.7.	Análisis del polimorfismo del gen <i>k26</i> y asignación de genotipos ST-K26.....	- 122 -
3.	RESULTADOS	- 123 -
3.1.	Actualización de la distribución de los genotipos ITS de <i>L. infantum</i> en España.....	- 123 -
3.2.	Análisis filogenético de los genotipos ITS.....	- 125 -
3.3.	Caracterización genotípica del gen <i>k26</i> y su variabilidad aminoacídica.	- 127 -
3.4.	Análisis de la estructura de los dominios repetitivos del gen <i>k26</i>	- 128 -
3.5.	Variabilidad genética a nivel de zimodemas	- 131 -
3.6.	Asociación de genotipos ITS y K26.....	- 133 -
4.	DISCUSIÓN.....	- 134 -

CAPÍTULO 3: Estudio de la estructura de poblaciones de *L. infantum* en España mediante el análisis de secuencias multilocus (MLSA). - 139 -

1.	ANTECEDENTES	- 141 -
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	- 142 -
2.1.	Cepas de <i>L. infantum</i>	- 142 -
2.2.	Extracción de ADN y amplificación de los siete marcadores moleculares	- 144 -
2.3.	Secuenciación de los productos de PCR	- 145 -
2.4.	Análisis de secuencias e interpretación de los perfiles alélicos	- 145 -
2.5.	Análisis filogenéticos.....	- 146 -
2.6.	Análisis de la estructura de las poblaciones	- 147 -
3.	RESULTADOS	- 147 -
3.1.	Análisis descriptivo de los siete genes que componen el sistema multilocus	- 147 -

3.2.	Identificación de Alelos y asignación de genotipos (ST) por marcador.....	- 150 -
3.3.	Análisis de genotipos LST generados a partir del sistema de multilocus (MLSA).....	- 152 -
3.4.	Análisis filogenético	- 156 -
3.5.	Determinación de la estructura de poblaciones mediante análisis bayesiano.....	- 158 -
3.6.	Poblaciones identificadas mediante el análisis filogenético (NJ y ML), y análisis bayesiano.....	- 159 -
4.	DISCUSIÓN.....	- 161 -

CAPÍTULO 4: Identificación molecular de los flebótomos de la región mediterránea mediante el análisis de la secuencia de ADN de los genes *cytb-nd1* - 165 -

1.	ANTECEDENTES	- 167 -
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	- 168 -
2.1.	Panel 1: Flebótomos capturados en España (N = 155).....	- 168 -
2.2.	Panel 2: Secuencias de ADN obtenidas del Genbank (N=277)	- 172 -
2.3.	Obtención de ADN y PCR para la región <i>cytb-nd1</i> del Panel 1.....	- 172 -
2.4.	Análisis de RFLP con <i>Ase I</i>	- 173 -
2.5.	Secuenciación del ADN de los productos de PCR <i>cytb-nd1</i>	- 173 -
2.6.	Alineamiento y edición de las secuencias de ADN.....	- 173 -
2.7.	Análisis “in-silico”, <i>Ase I</i> RFLP	- 174 -
3.	RESULTADOS	- 175 -
3.1.	<i>Cytb-nd1</i> PCR y <i>Ase I</i> RFLP en especímenes del Panel 1	- 175 -
3.2.	Alineamiento y edición de las secuencias de ADN del <i>cytb-nd1</i>	- 176 -
3.3.	Evaluación “in-silico” de los perfiles de <i>Ase I</i> RFLP de la región <i>cytb-nd1</i>	- 176 -
4.	DISCUSIÓN.....	- 182 -

CAPÍTULO 5: Aplicación de la metodología de código de barras de ADN (DNA Barcoding) para la identificación molecular de especies de flebótomos de la cuenca mediterránea - 185 -

1.	ANTECEDENTES	- 187 -
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	- 189 -
2.1.	Área de estudio de la Colección 1: flebótomos capturados en España, (n=155).....	- 189 -
2.2.	Revisión bibliográfica y búsqueda de secuencias de ADN de flebótomos	- 189 -
2.3.	Análisis Molecular de los flebótomos de la Colección 1	- 190 -
2.3.1.	Extracción y precipitación de los ácidos nucleicos del flebótomo	- 190 -
2.3.2.	Amplificación de las regiones del ADNmt seleccionadas para el análisis de códigos de barras de ADN	- 191 -
2.3.3.	Secuenciación.....	- 192 -
2.3.4.	Edición y alineamiento de las secuencias de la Colección 1	- 193 -
2.3.5.	Análisis de las secuencias de ADN de la Colección 1 y Colección	- 193 -
2.3.6.	Análisis de la distancia genética.....	- 193 -
2.3.7.	Reconstrucción filogenética	- 193 -
3.	RESULTADOS	- 194 -
3.1.	Evaluación de las identificaciones taxonómicas vs. Identificación molecular.	- 194 -

3.2.	Representación geográfica de las secuencias obtenidas para el Conjunto 2	- 197 -
3.3.	Particularidades del gen <i>coi</i> como marcador molecular.....	- 198 -
3.3.1.	Alineamiento y asignación de haplotipos en las secuencias <i>coi</i>	- 198 -
3.3.2.	Análisis de distancias genéticas del gen <i>coi</i>	- 202 -
3.4.	Particularidades del gen <i>cytb</i> como marcador molecular	- 204 -
3.4.1.	Alineamiento y asignación de haplotipos en las secuencias del gen <i>cytb</i>	- 204 -
3.4.2.	Análisis de las distancias genéticas en <i>cytb</i>	- 208 -
3.4.3.	Análisis filogenéticos	- 212 -
4.	DISCUSIÓN	- 218 -
IV. CONCLUSIONES.....		- 225 -
V. BIBLIOGRAFIA		- 229 -
VI. APÉNDICE.....		- 253 -
LISTA DE FIGURAS		- 255 -
LISTA DE TABLAS		- 263 -
VII. ANEXOS		- 267 -
	Publicaciones	- 303 -

RESUMEN

Los protozoos del género *Leishmania* son transmitidos al hombre mediante las picaduras infectivas de hembras de distintas especies de flebótomo (Diptera: Psychodidae), convirtiéndose en agentes causales de la leishmaniasis, cuyas manifestaciones clínicas dependen de diferentes factores asociados al parásito y al hospedador. Estas formas clínicas varían desde lesiones cutáneas localizadas hasta formas viscerales, las últimas pueden ser mortales sin tratamiento.

En Europa *Leishmania infantum* es el principal agente causal de la leishmaniasis cutánea y visceral, y las hembras de distintas especies del género *Phlebotomus* son los vectores implicados en su transmisión, la cual depende de un ciclo zoonótico en el que el perro es considerado el principal reservorio. La incidencia regional de la leishmaniasis se estima en menos del 2% de la carga global de la leishmaniasis de acuerdo con la estimación reciente de la OMS. Sin embargo, se considera que hay una importante subnotificación debido a la ausencia de un sistema de vigilancia centralizado. Durante la última década varios estudios epidemiológicos han demostrado un incremento de la prevalencia de leishmaniasis en algunos países endémicos, así como la aparición de nuevos focos relacionados con la propagación de la enfermedad hacia el norte del continente europeo. Esta re-emergencia de la leishmaniasis parece estar asociada a diversos factores de riesgo, consecuencia principalmente de cambios ambientales y un incremento en las condiciones de inmunosupresión. En este escenario destaca el brote de leishmaniasis de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM). Que desde sus inicios en julio de 2009 hasta mayo de 2015 causó 644 casos, incrementando la tasa de incidencia de la enfermedad en la región de 2,44 casos/100.000 habitantes en 2009 a 18,91 casos/100.000 habitantes en 2015. Este brote, sin precedentes en Europa, fue consecuencia de un ciclo de transmisión silvestre que entró en contacto con la población como consecuencia de cambios ambientales de origen humano.

Esta nueva dinámica de la epidemiología de la leishmaniasis pone de manifiesto la necesidad de establecer medidas de vigilancia que permitan seguir la propagación de las poblaciones de parásito y vector, y ayudar a establecer las medidas de control adecuadas. En este contexto las herramientas de biología molecular, por su elevada procesividad y capacidad de discriminación, resultan de gran utilidad. Siguiendo esta idea nos planteamos como objetivo general de esta Tesis Doctoral la validación de una serie de herramientas de tipado molecular que aportasen al conocimiento de la epidemiología de la leishmaniasis, y que pudiesen utilizarse en la vigilancia de *L. infantum* y sus vectores. Para abordar este objetivo nos planteamos cinco estudios.

En el **primer estudio** se analizaron las regiones microsatélites comprendidas en los espaciadores transcritos internos-1 y -2 de 73 cepas de *L. infantum* aisladas en la CAM 2008 y 2012, mostrando que la mayoría de los aislados del brote compartían el mismo genotipo, identificado también en el reservorio silvestre implicado en la transmisión a humanos durante el brote. Este genotipo, ITS-LOMBARDI, había pasado inadvertido en previos estudios llevados a cabo con aislados de *L. infantum* de la cuenca de mediterránea. La sospecha de que pudiera tratarse de un genotipo nuevo nos llevó a analizar un segundo conjunto de 83 cepas de *L. infantum* aisladas entre 1988 y 2005 en la Comunidad de Madrid, comprobándose que el genotipo ITS-LOMBARDI ya se encontraba circulando en distintas regiones de la CAM, al menos desde el año 1992. Tras estos hallazgos decidimos realizar un **segundo estudio** para estudiar la figura completa a nivel nacional, analizando una colección de 550 cepas de *L. infantum*, diversas a nivel de zóndema y origen geográfico, obtenida de diferentes hospedadores entre 1986 y 2015. Tras el análisis confirmamos que este genotipo estaba ampliamente distribuido en otras regiones del país, al menos desde hace casi 30 años y se identificó una nueva variante llamada ITS-LISA. La existencia de genotipos más prevalentes entre los aislados del brote se confirmó al combinar los datos de ITS con los de un segundo marcador, K26.

En un **tercer estudio** utilizamos una aproximación de *MultiLocus Sequence Analysis (MLSA)*, con la idea de investigar la estructura de poblaciones de *L. infantum* en Eurasia (incluyendo aislados del brote de la CAM) y África. Validamos un panel de siete marcadores moleculares en 385 cepas, y demostramos la existencia de al menos tres grandes poblaciones de *L. infantum* circulando en España, englobando dos de las poblaciones a todos los aislados del brote de la CAM.

Siendo la leishmaniasis una enfermedad transmitida por vector, consideramos importante considerar este componente como parte de un sistema de vigilancia molecular de la leishmaniasis. En el **cuarto estudio** nos planteamos la validación de un protocolo de PCR-RFLP, que utiliza como diana los genes *cytb* y *nd1* del flebótomo, para la identificación de especies de flebótomos de la cuenca mediterránea. Para ellos estudiamos un total de 155 flebótomos pertenecientes a cuatro especies, incluyendo los vectores de *L. infantum*, *Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi*, que fueron capturados en distintas regiones de España. Este conjunto de datos se completó con secuencias de ADN disponibles en el Genbank para especies de flebótomo presentes en la cuenca mediterránea y Oriente Medio. Nuestros resultados revelaron que este método no era capaz de discriminar de manera específica todas las especies de flebótomos del área de estudio.

Por ello, en un **quinto estudio**, decidimos aplicar otra aproximación en la misma muestra del cuarto estudio, siguiendo la metodología de *DNA barcoding*, y utilizando como diana los genes *cytb* y *coi*. Esta metodología nos permitió distinguir todas las especies de flebótomos de nuestra muestra de manera inequívoca, mostrando una concordancia del 100% con la taxonomía

morfológica. Además, el análisis filogenético de los genes *cytb* y *coi* permitió discriminar subpoblaciones en función del origen geográfico dentro de una misma especie.

Actualmente la caracterización molecular de los aislados patógenos desempeña un papel central en la epidemiología de las enfermedades infecciosas, dado que genera la información necesaria para identificar, rastrear e intervenir contra los brotes de enfermedades. En este sentido, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral pueden contribuir significativamente a mejorar la comprensión de la distribución geográfica y temporal de los distintos genotipos de *L. infantum* y sus vectores, estableciendo la información necesaria para crear un sistema de vigilancia molecular de la leishmaniasis en España.

Palabras clave: *Leishmania infantum*, leishmaniasis, ITS, K26, MLSA, *Phlebotomus*, flebótomos, *coi*, *cytb*, vigilancia

ABSTRACT

Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by flagellated protozoans of the genus *Leishmania*, parasites are transmitted by the bite of infected phlebotomine sand flies species (Diptera: Psychodidae). Clinical manifestations depend on different factors associated with the parasite and the host, ranging from localized skin lesions to visceral forms, the latter being deadly without treatment.

In Europe, *Leishmania infantum* is the primary causative agent of cutaneous and visceral leishmaniasis, and females of different species of the genus *Phlebotomus* are the vectors involved in its transmission, which depends on a zoonotic cycle in which the dog is considered the main reservoir. The regional incidence of leishmaniasis is estimated at less than 2% of the overall burden of leishmaniasis according to the WHO recent estimate. However, is underestimated due to the absence of a centralized surveillance system.

During the last decade, several epidemiological studies have shown an increase in the prevalence of leishmaniasis in some endemic countries, as well as the appearance of new outbreaks related to the spread of the disease towards the north of the European continent. This re-emergence of leishmaniasis appears to be associated with several risk factors, mainly as a result of environmental changes and an increase in immunosuppression conditions. In this scenario stands out the outbreak of leishmaniasis of the Autonomous Community of Madrid (CAM). From July 2009 to May 2015 a total of 644 cases have been reported, increasing the incidence rate of the disease in the region from 2.44 cases/100,000 inhabitants in 2009 to 18.91 cases /100,000 inhabitants in 2015. This exceptional outbreak in Europe was a consequence of a wild cycle of transmission that came into contact with the population as a result of environmental changes of human behavior.

This new dynamics of the epidemiology of leishmaniasis highlights the need to establish surveillance measures to monitor the spread of parasite and vector populations and to help develop appropriate control measures. In this context, the tools of molecular biology, due to their high processivity and discrimination power, are very useful. Following this idea, we propose as a general objective of this Doctoral Thesis, the validation of different molecular typing tools that contribute to the knowledge of the epidemiology of leishmaniasis, and that could be used in the surveillance of *L. infantum* and its vectors. In order to address this objective, we propose five studies.

In the first study, we analyzed the microsatellite regions included in the internal transcribed spacers-1 and -2 of 73 strains of *L. infantum* isolated from CAM obtained from 2008 and 2012,

showing that most of the isolates from the outbreak shared the same genotype as the wild reservoir involved in the transmission. This genotype, ITS-LOMBARDI, had gone unnoticed in previous studies carried out with isolates of *L. infantum* from the Mediterranean basin. The suspicion that this could be a new genotype led us to analyze a second set of 83 strains of *L. infantum* isolated between 1988 and 2005 in the CAM, being verified that the ITS-LOMBARDI genotype was already circulating in different regions of the CAM, at least since 1992.

After these findings we decided to carry out a second study to study to complete the figure at the national level, analyzing a collection of 550 strains of *L. infantum*, different at zimodema level and geographical origin, obtained from various hosts between 1986 and 2015. After the analysis, we confirmed that this genotype was widely distributed in other regions of the country, at least for almost 30 years. Also, a new variant called ITS-LISA was identified. The existence of more prevalent genotypes among outbreak isolates was confirmed by combining ITS data with those of a second marker, K26.

In a third study, we used a Multilocus Sequence Analysis (MLSA) approach, with the idea of studying the population structure of *L. infantum* in Eurasia (including isolates from the CAM outbreak) and Africa. We validated a panel of seven molecular markers in 385 strains, and we demonstrated the existence of at least three large populations of *L. infantum* circulating in Spain, showing that all isolates from the CAM outbreak were including in two of the populations.

Since leishmaniasis is a vector-borne disease, we consider important this component as part of a molecular surveillance system for leishmaniasis. In the fourth study, we proposed the validation of a PCR-RFLP protocol, targeting the *cytb* and *nd1* genes of the sandfly, for the identification of sandfly species in the Mediterranean basin. We studied a total of 155 sandflies belonging to four species, including the vectors of *L. infantum*, *Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi*, which were captured in different regions of Spain. This dataset was completed with DNA sequences available from the Genbank for phlebotomine species present in the Mediterranean basin and the Middle East. Our results revealed that this method was not able to discriminate in a specific way all the phlebotomine species of the study area.

Therefore, in a **fifth study**, we decided to apply another approach in the same sample of the fourth study, following the methodology of DNA barcoding and targeting the *cytb* and *coi* genes. This method allowed us to distinguish all sandfly species from our sample unambiguously, showing a 100% concordance with the morphological taxonomy. In addition, the phylogenetic analysis of the *cytb* and *coi* genes allowed to discriminate subpopulations according to the geographic origin within the same species.

Currently the molecular characterization of pathogen isolates plays a central role in the epidemiology of infectious diseases, since it generates the information necessary to identify, track

and intervene against outbreaks of disease. In this sense, the results presented in this Doctoral Thesis can contribute significantly to improve the understanding of the geographical and temporal distribution of the different genotypes of *L. infantum* and their vectors, establishing the necessary information to create a system of molecular surveillance of leishmaniasis in Spain.

I. INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES

Bajo el nombre de leishmaniasis se engloban un amplio grupo de enfermedades, cuyas manifestaciones clínicas varían desde úlceras cutáneas localizadas, que en ocasiones curan espontáneamente, hasta graves afecciones viscerales que pueden ser fatales sin tratamiento (Murray *et al.*, 2005). Los agentes causales son distintas especies de protozoos del género *Leishmania* que son transmitidos mediante la picadura de las hembras de un insecto vector, el flebótomo. Cabe resaltar que la mayoría de las formas de leishmaniasis son consecuencia de un ciclo de transmisión zoonótico, en el que distintas especies de mamíferos pueden jugar el papel de reservorio y donde ocasionalmente la infección es transmitida al hombre. En determinadas regiones la transmisión es antroponótica, y en este caso el hombre es a la vez reservorio y víctima del parásito (WHO, 2010).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye la leishmaniasis humana en el grupo de enfermedades tropicales olvidadas (NTDs: *Neglected Tropical Diseases*), y la clasifica como enfermedad de Categoría I: emergente y sin control (Brooker & Utzinger, 2007; WHO, 2010). Es la tercera enfermedad parasitaria más importante, en cuanto a morbilidad y mortalidad, después de la malaria y la filariasis linfática (Bern *et al.*, 2008). En la mayoría de países endémicos la transmisión de la leishmaniasis está estrechamente relacionada con el contexto eco-epidemiológico de la pobreza, como la precariedad de las viviendas, desplazamiento de poblaciones y malnutrición. Y al mismo tiempo, los costes asociados al acceso al diagnóstico y tratamiento, y las secuelas de la enfermedad, contribuyen a empobrecer aún más a las familias afectadas (Alvar *et al.*, 2006).

La leishmaniasis es una enfermedad dinámica, cuya epidemiología se ha visto y se ve afectada por diversos cambios globales, como alteraciones ambientales y movimientos de poblaciones que propician el contacto entre el hombre y el vector; o el aumento de las condiciones asociadas a inmunosupresión, como el VIH/SIDA, la malnutrición, o el uso de terapias inmunosupresoras, que favorecen las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis tras la infección (Aagaard-Hansen *et al.*, 2010; Desjeux, 2001; Gálvez *et al.*, 2011; Jonsson & Reid, 2000; López-Vélez & Molina Moreno, 2005; Randolph, 2009; Semenza & Menne, 2009).

1.1. Distribución e impacto global

La leishmaniasis es transmitida en el contexto de ciclos silvestres, domésticos y peri-domésticos, y en un rango geográfico que incluye desde selvas tropicales a desiertos y ciudades, en todos los continentes excepto la Antártida. La leishmaniasis humana es endémica en 98 países, donde 2 millones de casos nuevos se producen anualmente, aproximadamente 1.5 millones de casos de leishmaniasis cutánea (LC) y 0.5 millones de visceral (LV) (Bern *et al.*, 2008; Desjeux, 1996; WHO, 2013). No obstante, la mayoría de los casos se concentra en un número reducido de países. Por ejemplo, el 90% de los casos de LV ocurren en Bangladés, Brasil, Etiopía, India, Sudán del Sur y Sudán; mientras que más del 70% de los casos de LC ocurren en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Irán, Perú, Sudán y Siria (Alvar *et al.*, 2012; Desjeux, 2004; WHO, 2013) (Figura 1).

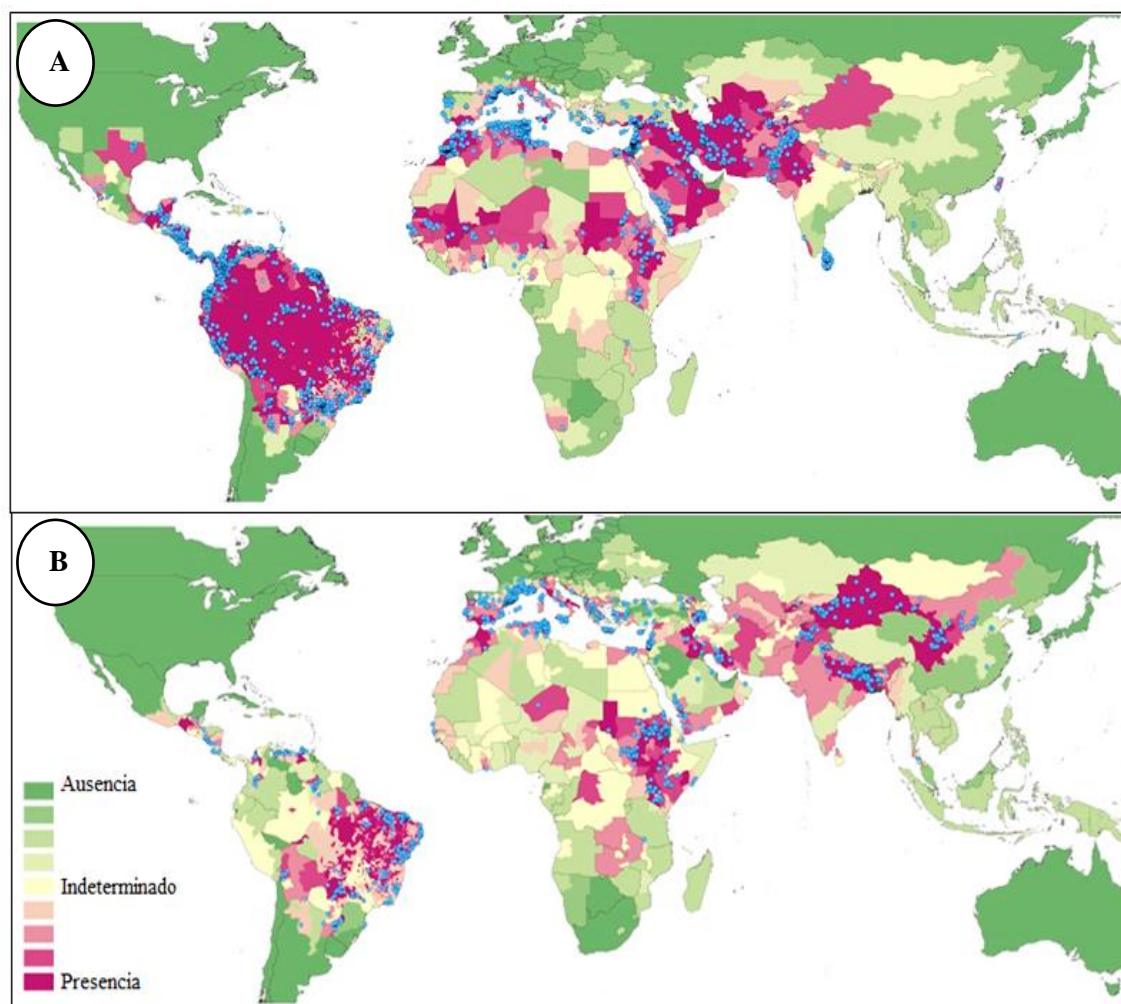


Figura 1. Mapa de la distribución global de la leishmaniasis cutánea (A) y leishmaniasis visceral (B). Los puntos en azul representan los focos o brotes puntuales acontecidos en pequeñas comunidades (Adaptado de Pigott *et al.*, 2014).

Se estima que 310 millones de personas están en riesgo de adquirir leishmaniasis, y que la prevalencia global es de 12 millones de casos. En cuanto a la carga de enfermedad, la leishmaniasis se cobra aproximadamente 3 millones de años de vida ajustados por discapacidad y 40.000 muertes anuales (Alvar *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2005; Pigott *et al.*, 2014; WHO, 2004). No obstante, se estima que existe una importante sub-notificación de casos de leishmaniasis, debido al hecho de que las áreas afectadas son en su mayoría rurales y no se benefician de un buen sistema de salud, además de que solo es una enfermedad de declaración obligatoria en 33 de los 98 países endémicos (Alvar *et al.*, 2012; Hotez *et al.*, 2008).

1.2. Clasificación taxonómica del género *Leishmania*

Leishmania es un protozoo perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, cuyos miembros se caracterizan por la presencia de un único flagelo. Esta familia pertenece a la clase *Kinetoplastida*, que se caracteriza por la presencia de un organelo denominado kinetoplasto, rico en ADN, que corresponde a la única mitocondria de estos protozoos, situada en las proximidades del cuerpo basal del flagelo. Actualmente se acepta la clasificación taxonómica propuesta de Cavalier-Smith, (1998) (Tabla 1):

Tabla 1. Posición taxonómica de *Leishmania infantum* (Cavalier-Smith, 1998)

Reino	Protozoa
Filo	Euglenozoa
Subfilo	Saccostoma
Clase	Kinetoplastea
Orden	Trypanosomatida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>
Especie	<i>infantum</i>

El género *Leishmania* engloba los subgéneros *Viannia*, restringido a la región neotropical, y *Leishmania*, que habría surgido en África distribuyéndose posteriormente a Eurasia, y algunas de sus especies habrían colonizado la región neotropical como resultado de múltiples introducciones (Momen & Cupolillo, 2000). Estos dos subgéneros se diferencian entre sí por su emplazamiento una vez colonizan el aparato digestivo del vector (Lainson *et al.*, 1987). Antes de que las formas infectivas migren hacia la válvula estomodeal del flebótomo, las especies del subgénero *Viannia* (e.g. *L. braziliensis*) colonizan la región anterior, media y posterior del tubo digestivo, mientras

que las especies del subgénero *Leishmania*, limitan su desarrollo al entorno del intestino medio (Lainson *et al.*, 1987; Rioux *et al.*, 1990). Cada subgénero comprende varios complejos y cada uno a su vez una o varias especies, de las cuales al menos 20 se consideran patógenas para el hombre (Ashford, 2000; Maroli *et al.*, 2013).

La clasificación e identificación de las diferentes especies de *Leishmania* ha cambiado constantemente desde el descubrimiento del parásito. Inicialmente la posición sistemática de *Leishmania* se ha establecido según criterios eco-biológicos, como pueden ser: el vector, la distribución geográfica, el tropismo tisular y las manifestaciones clínicas (Lainson *et al.*, 1987). Sin embargo, el uso de marcadores bioquímicos y moleculares ha ido adquiriendo cada vez mayor importancia en taxonomía (Bañuls *et al.*, 2007). Si bien la clasificación original en dos subgéneros propuesta por Lainson *et al.*, (1987) ha sido corroborada mediante análisis filogenéticos basados en distintas regiones del genoma de *Leishmania* (Bañuls *et al.*, 2007; Schönian *et al.*, 2010) (Figura 2). Actualmente se considera que el análisis de la secuencia del gen que codifica para la proteína de choque térmico HSP70 puede utilizarse para clasificar de manera acertada las especies de *Leishmania* (Fraga *et al.*, 2010; Van der Auwera & Dujardin, 2015). No obstante, la taxonomía de *Leishmania* se encuentra en revisión (Fraga *et al.*, 2013; Schönian *et al.*, 2010).

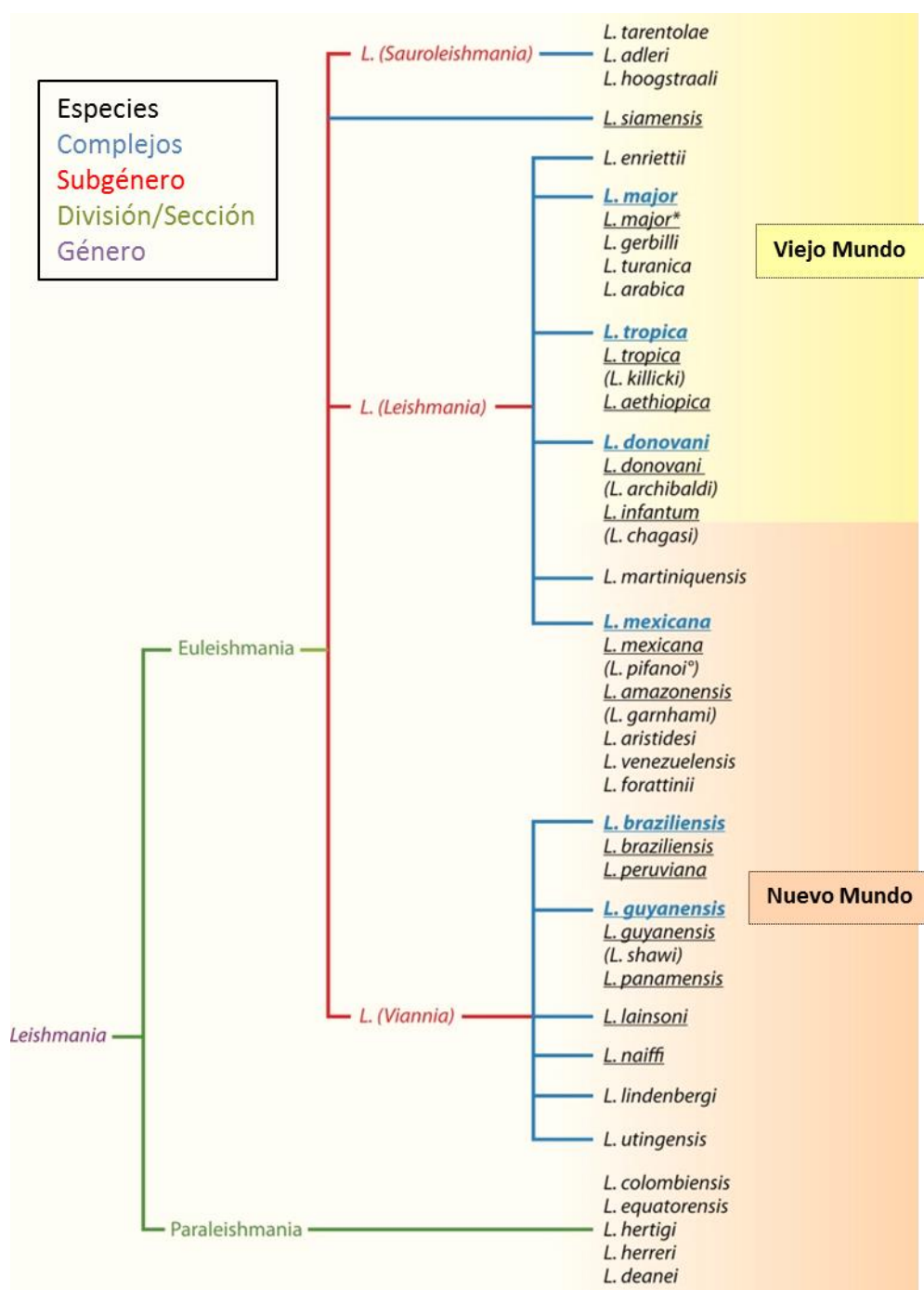


Figura 2. Taxonomía basada en el análisis de MLEE del género *Leishmania*, conforme a la descripción realizada por Schönian *et al.*, (2010). Los diferentes niveles taxonómicos están indicados en colores distintos. Varias especies (en negro) se agrupan en complejos de especies (azul), por lo que el complejo lleva el nombre de una de sus especies. Las especies están subrayadas según lo documentado en los estudios actuales. Los nombres de las especies que están entre paréntesis no son reconocidos por la mayoría de los autores como especies diferentes de la indicada en la parte superior; por ejemplo *L. chagasi* y *L. archibaldi* no se reconocen como especies, sino como sinónimos de *L. infantum* y *L. donovani* respectivamente.

1.3. Morfología del Parásito

Las especies del género *Leishmania* presentan un ciclo de vida digénico o heteróximo, en el que alternan entre una forma de amastigote intracelular en un hospedador vertebrado y una forma promastigote extracelular en el insecto vector (Figura 3).

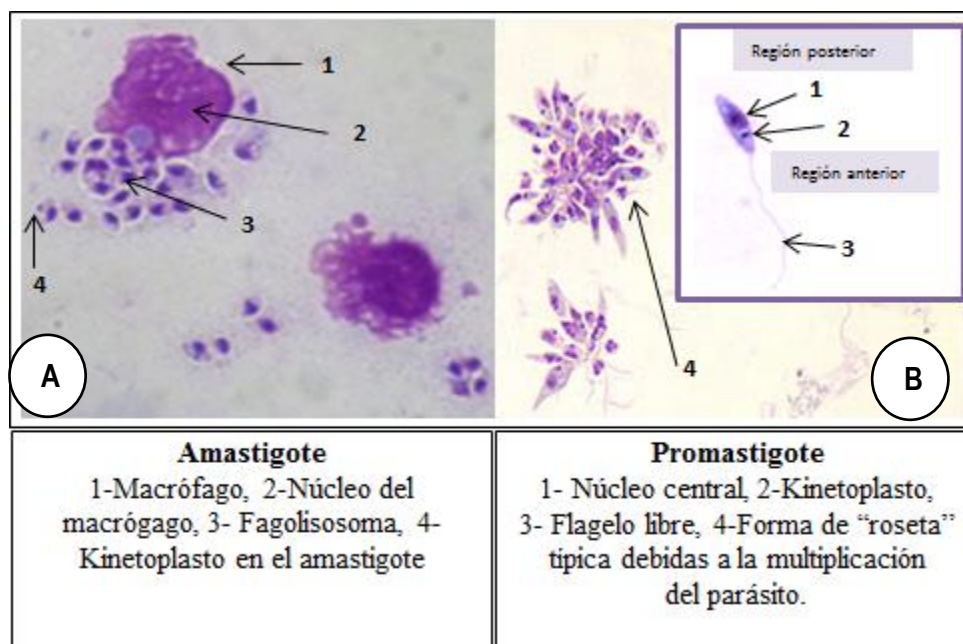


Figura 3. Morfología de las formas amastigote y promastigote de *L. infantum* en tinción con Giemsa y detalle de las estructuras intracelulares. (A): Amastigotes infectando macrófagos in vitro, forma intracelular, redondeada, de 2 a 6 μm . (B): Promastigotes en cultivo, forma extracelular, alargada, con flagelo anterior, de 7-15 μm de tamaño.

Los **amastigotes** son la forma aflagelada, son intracelulares obligados de monocitos y macrófagos del hospedador vertebrado (Marín *et al.*, 2013). Tienen forma ovalada o fusiforme, con un diámetro de unos 2-6 μm y carecen de motilidad, debido a que el flagelo no emerge del cuerpo celular. Poseen núcleo, un kinetoplasto adyacente a éste y, observable con un microscopio electrónico, un reservorio flagelar donde se encuentran los rudimentos de un flagelo.

Los **promastigotes** se desarrollan en el intestino del vector flebótomo, es una forma extracelular que también podemos observar en los medios de cultivos. Son fusiformes, de 7-15 μm de longitud y móviles gracias a la presencia de flagelo libre que emerge de la parte anterior de su cuerpo. El núcleo central y el kinetoplasto se observan en la parte anterior, así como un flagelo libre, bien desarrollado, que usan tanto para la propulsión como para fijarse a las microvellosidades del intestino del flebótomo. Tanto los amastigotes como los promastigotes se dividen repetidamente por fisión binaria longitudinal (Ashford, 2000) y se pueden cultivar en medios de cultivo líquidos.

También se pueden obtener formas amastigotes intracelulares utilizando líneas celulares de macrófagos.

1.4. Ciclo biológico

El ciclo de transmisión de *Leishmania* es complejo, y resulta de la interacción parásito-reservorio-vector, siempre supeditada a la existencia de condiciones ambientales que favorezcan el contacto entre todos los componentes del ciclo. Las distintas especies de *Leishmania* presentan distintas particularidades en los ciclos epidemiológicos (Ashford, 1996; Palatnik-de-Sousa & Day, 2011). Al tratarse de parásitos pleomórficos presentan un ciclo de vida diheteroxeno, el cual se completa en dos hospedadores, el insecto vector y el hospedador vertebrado (Dedet & Pratlong, 2003; Gallego-Berenguer, 2003; Gallego, 2004) (Figura 4).

En el hospedador vertebrado: Cuando una hembra de flebótomo parasitada pica a un hospedador e ingurgita su sangre, inocula con su saliva la forma infectiva de *Leishmania*, el promastigote metacíclico (Alcover *et al.*, 2012; de Almeida, 2002). Los promastigotes inoculados son fagocitados por los macrófagos del hospedador e incluidos en una vacuola parasitófora o fagolisosoma. *Leishmania* puede resistir la agresión del macrófago adaptándose para sobrevivir en el fagolisosoma, diferenciarse a amastigote y multiplicarse (Sharma & Singh, 2008). En este punto, la progresión de la enfermedad depende fundamentalmente de las condiciones del hospedador (eficacia de la respuesta inmune), de la virulencia del parásito y de la dosis infectante inoculada por el vector (Reithinger *et al.*, 2007). Consecutivamente, la multiplicación de los parásitos colapsa los macrófagos liberando amastigotes que infectan nuevos fagocitos, aumentando la carga parasitaria en el hospedador. Las cepas o especies viscerotropas se diseminan hacia los órganos del sistema retículo endotelial, principalmente hígado, bazo y médula ósea, a través de la circulación sanguínea. Sin embargo, las cepas o especies dermatropas generalmente se mantienen localizadas junto al punto de inoculación, causando la enfermedad cutánea, pudiendo haber dispersión tardía hacia porciones de piel adyacentes, tejido o nódulos linfáticos próximos, o incluso hacia la mucosa orofaríngea (Alvar, 2001; Neuber, 2008).

En el hospedador invertebrado: Cuando la hembra del flebótomo ingurgita sangre de un hospedador vertebrado infectado, se produce la infección del vector, iniciándose el ciclo extracelular/intravectorial. En el aparato digestivo del vector, los macrófagos son digeridos, quedando libres los amastigotes. Estos se diferencian a promastigotes procíclicos que se multiplican adheridos al epitelio intestinal del flebótomo. Tras varios días y tras un proceso de metaciclogénesis, alcanzan la capacidad infectante y migran hacia la probóscide del vector,

agrupándose en la válvula estomodeal, donde permanecen a la espera de ser inoculados a otro hospedador en una nueva picadura, continuando así el ciclo.

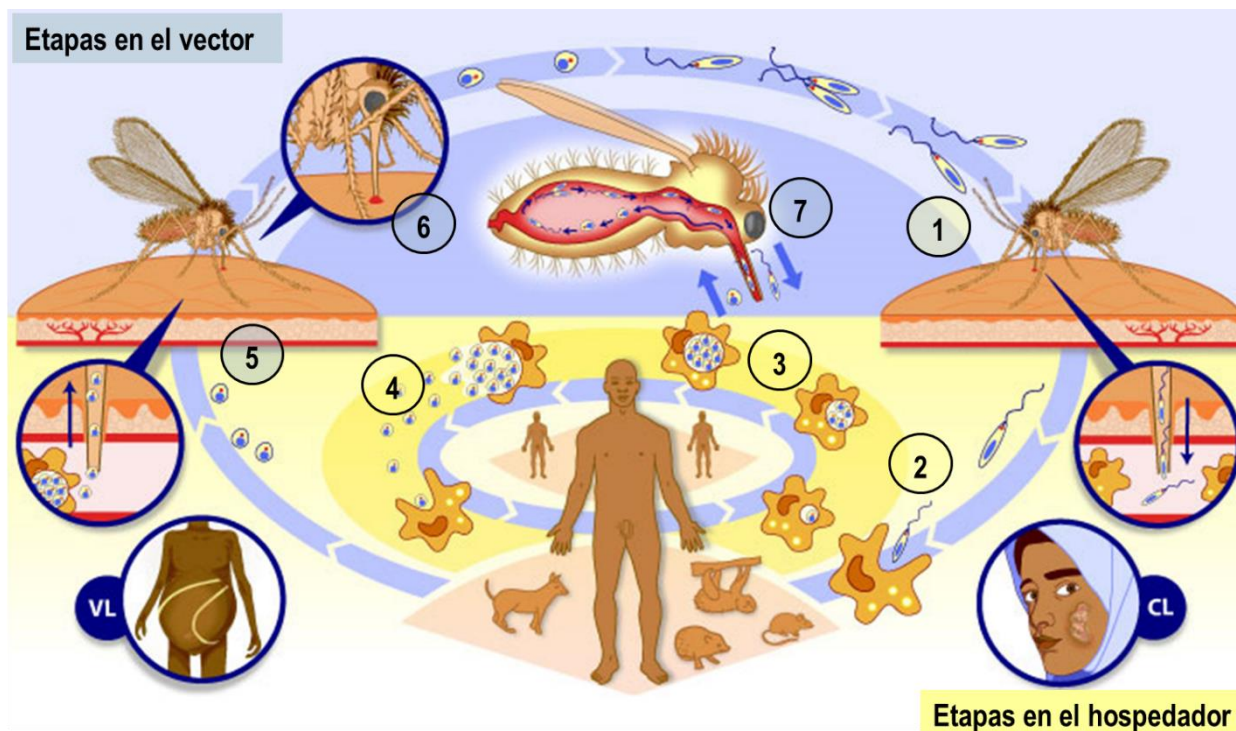


Figura 4. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. VL: leishmaniasis Visceral. CL: leishmaniasis cutánea. Adaptado de www.who.int/tdr

1.4.1. Vectores

Las hembras de los flebótomos son los únicos insectos hematófagos capaces de transmitir la leishmaniasis (Ready, 2010). Taxonómicamente los flebótomos son dípteros nematóceros incluidos en la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* (Killick-Kendrick, 1999) (ver Tabla 2). Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de piezas bucales más largas que la cabeza, los palpos segmentados, las mandíbulas desarrolladas, las antenas casi cilíndricas y la vena radial del ala distribuida en cinco ramas. Además son insectos de pequeño tamaño, entre de 2 a 3 mm de longitud, de color amarillento pálido, con tórax giboso, alas lanceoladas y peludas de venación característica, de casi igual longitud que el cuerpo y que en posición de reposo forman una “V”, patas muy largas y con todo el cuerpo recubierto de abundante pilosidad (Gil-Collado *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 2010; Killick-Kendrick, 1999) (Figura 5).

La clasificación de los *Phlebotominae* es confusa. Esto se debe principalmente tres hechos principales: i) a la carencia de unas claves consenso para la identificación morfológica, ii) al hecho de que en muchas especies no se han descrito todas las formas del ciclo biológico y iii) la información que se esta obteniendo de las técnicas moleculares, y la continua descripción de nuevas especies, hacen que la taxonomía y filogenia estén lejos de ser definitivas (Ready, 2013).

La clasificación taxonómica de flebótomos más comúnmente aceptada en la actualidad es la descrita por Lewis *et al.*, (1977), en la cual se reconocen tres géneros de flebótomos en el Nuevo Mundo (*Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya*) y dos en el Viejo Mundo (*Phlebotomus* y *Sergentomyia*). Sin embargo, los géneros capaces de transmitir *Leishmania* spp. son *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (Reithinger *et al.*, 2007).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de los flebótomos.

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Mandibulata
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Suborden	Nematocera
Familia	Psychodidae
Subfamilia	Phlebotominae
Género	<i>Phlebotomus</i> <i>Lutzomyia</i>




Figura 5. Hembra adulta de *Phlebotomus* spp.

Los flebótomos se encuentran ampliamente distribuidos en zonas templadas, desde la selva húmeda hasta ambientes muy áridos, con una distribución altitudinal desde por debajo del nivel del mar (en el Mar Muerto) hasta los 3.300 metros (en Afganistán) (Killick-Kendrick, 1999; Maroli *et al.*, 2013). Su distribución se extiende hacia el norte hasta la latitud 50°N en el sudoeste de Canadá y por debajo de esta latitud en el norte de Francia y Mongolia. Por el sur, su distribución llega hasta la latitud 40°S, aunque no se encuentran en las islas del Pacífico y Nueva Zelanda (Killick-Kendrick, 1999; Lane & Crosskey, 1993). En el mundo existen aproximadamente 900 especies de flebótomos, aunque la mayor parte de ellas no juegan un rol en la transmisión de la leishmaniasis, aproximadamente 70 han sido implicadas como vectores de la leishmaniasis (Ready, 2013; Secombe *et al.*, 1993).

Algunas especies de flebótomos transmiten únicamente una especie de *Leishmania* (vectores específicos), mientras que otras pueden transmitir varias especies (vectores permisivos). Este fenómeno se debe a las interacciones parásito-vector relacionadas tanto con moléculas específicas de la membrana del parásito (lipofosfoglicanos), como con la actividad enzimática del aparato digestivo del flebótomo. La cual determina que algunas especies de *Leishmania* puedan ser capaces de dirigirse a la porción anterior del aparato digestivo, o por el contrario, ser excretadas con el resto de la sangre digerida (Volf & Myskova, 2007). En consecuencia, la transmisión natural de *Leishmania* solo ocurre en lugares donde estén presentes las especies de vectores competentes (Killick-Kendrick, 1999; Volf *et al.*, 2008). La supervivencia del parásito durante las épocas en las que no existe transmisión vectorial, es sostenida en los hospedadores vertebrados susceptibles, ya que no se ha observado transmisión transovárica de *Leishmania* en los flebótomos (Bates, 2007).

1.4.1.1. Ciclo vital y hábitos

Los flebótomos son insectos holometábolos que presentan **cuatro etapas de desarrollo**: huevo, larva, pupa y adulto (WHO, 2010) (Figura 6). La puesta de huevos se realiza en lugares arenosos, en penumbra, húmedos, con temperatura constante y ricos en materia orgánica, como madrigueras, huecos en árboles, leñeras, vertederos, etc. Para el desarrollo de los estadios inmaduros se requieren temperaturas en torno a los 20 - 25°C y humedades relativas superiores al 90%. La eclosión de los huevos (0,3-0,5 mm) es altamente dependiente de la temperatura, mientras que el desarrollo larval es lento. En general las larvas emergen en 12-19 días, las pupas en 25-59 días, y los adultos o imagos en 35-69 días (Maroli *et al.*, 2013; Volf & Volfova, 2011). Tanto los machos como las hembras necesitan de carbohidratos para la energía, principalmente el azúcar en el néctar de las plantas (Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1987; Ribeiro *et al.*, 1986). Las hembras, además, son hematófagas, ya que necesitan de al menos una ingesta de sangre para el pleno desarrollo de los huevos, pudiendo obtener la sangre de mamíferos, aves, reptiles o anfibios (Killick-Kendrick, 1999; WHO, 2010). Su aparato picador-chupador consta de piezas muy cortas y fuertes con las que seccionan capilares y produce charcos de sangre en la dermis, de los que aspiran la sangre directamente, procedimiento que se conoce como telmofagia (Krenn & Aspöck, 2012).

El tiempo desde que una hembra se alimenta de sangre infectada hasta que pueda transmitir *Leishmania* es probablemente 1-3 semanas, si bien puede ser variable en función del ciclo gonotrófico de cada especie, las condiciones ambientales, y el tipo de azúcares en la dieta del

flebótomo (Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1987; Müller & Schlein, 2004). Las preferencias de los vectores a la hora de buscar una fuente de ingesta de sangre varían según las especies y la disponibilidad de hospedador (Warburg & Schlein, 1986; WHO, 2010).

El periodo de actividad de los adultos es principalmente el crepuscular y nocturno, siempre que las temperaturas superen los 16-18°C y la lluvia y el viento no estén presentes, es de destacar su marcado fototropismo positivo (Sharma & Singh, 2008). En regiones tropicales son activos durante todo el año, mientras que en regiones templadas entran en diapausa durante la estación invernal (Ready, 2013). Su vuelo es silente, en vuelos cortos, como pequeños saltos, por lo que generalmente recorren distancias cortas de entre 200 a 2.500 m (Guy *et al.*, 1984; Killick-Kendrick, 1999; Sharma & Singh, 2008). Por lo tanto, las actividades de adultos suelen limitarse a las inmediaciones de los criaderos de larvas, generalmente madrigueras, corrales de animales, etc. (WHO, 2010).

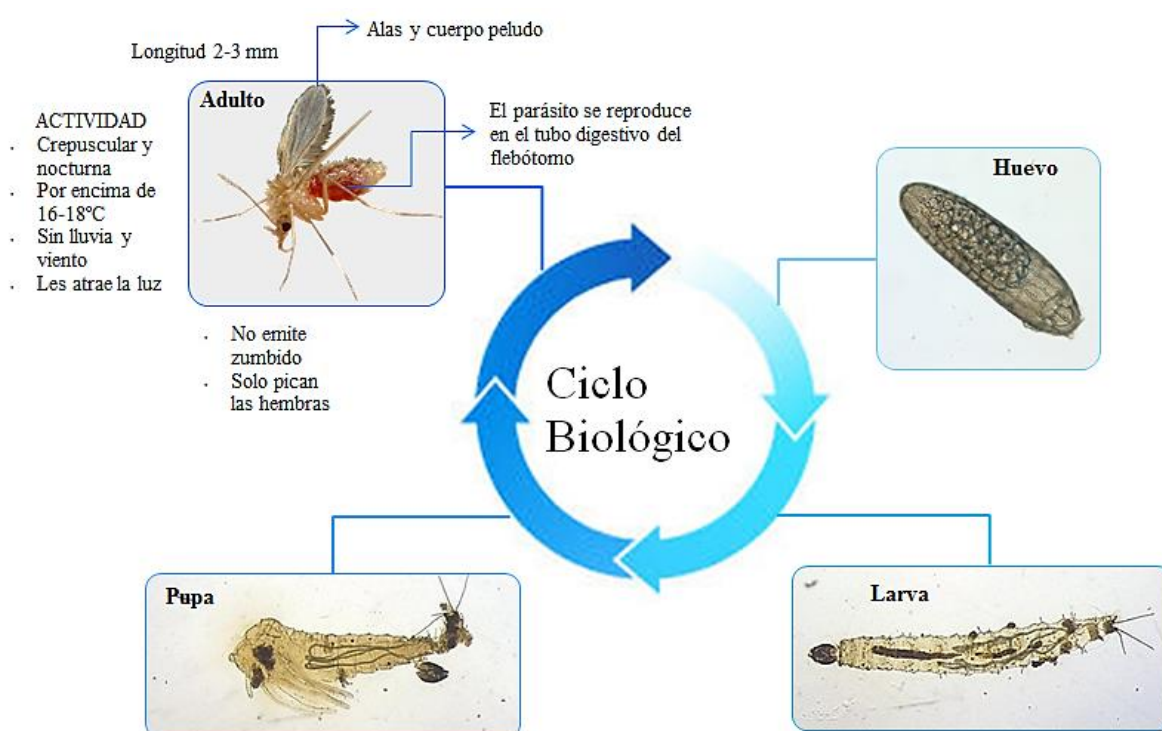


Figura 6. Ciclo biológico de los flebotomos. Elaboración propia a partir de imágenes tomadas del portal www.grupoleishmania.org.

1.4.1.2. Criterios de incriminación como vector de la leishmaniasis

Para ser considerado vector de *Leishmania* con riesgo para el humano, una especie de flebótomo debe cumplir los siguientes criterios (WHO, 2010):

- 1) debe ser antropofílico,
- 2) debe picar al reservorio,
- 3) debe encontrarse en la naturaleza infectado con la misma especie de *Leishmania* que la encontrada en humanos,
- 4) debe soportar el crecimiento del parásito que transmite y
- 5) debe ser capaz de transmitir el parásito a través de la picadura.

En muchas ocasiones estos criterios son difíciles de probar en su conjunto y diversos autores involucran vectores de manera condicional en diferentes áreas, aunque con suficiente evidencia de su participación en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis (WHO, 2010).

1.4.1.3. Flebótomos como vectores de la leishmaniasis en la cuenca mediterránea

En el entorno de la cuenca mediterránea, una docena de especies del género *Phlebotomus* han sido implicados en la transmisión de *L. infantum*, de los cuales 8 han sido incriminados como vectores bajo criterios convencionales: *Phlebotomus ariasi*, *P. balcanicus*, *P. kandelakii*, *P. langeroni*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. perniciosus* y *P. tobbi*. A excepción de *P. balcanicus*, que pertenece al subgénero *Adlerius*, el resto de especies vectores de *L. infantum* son miembros del subgénero *Larrousius* (Bettini *et al.*, 1986; Doha & Shehata, 1992; Giorgobiani *et al.*, 2012; Killick-Kendrick, 1990; Léger *et al.*, 2000, 1988; Maroli *et al.*, 1987; Rioux *et al.*, 1979, 1980; WHO, 2010). En algunas regiones más de una especie puede ser responsable de *Leishmania*. Por otra parte, los principales vectores de *L. major* son *P. papatasi*, *P. caucasicus*, *P. duboscqi*, *P. bergeroti*, mientras que para *L. tropica* los vectores son *P. sergenti*, y *P. chabaudi* (WHO, 2010). La Tabla 3 describe la distribución geográfica de los vectores de las distintas especies de *Leishmania* presentes en la cuenca mediterránea y regiones aledañas.

Los trabajos realizados por Gil *et al.*, (1989) y Gallego-Berenguer *et al.*, (1992) han ofrecido una visión de conjunto de la distribución, morfología y biología de estos dípteros en el territorio español. Los primeros autores indicaron que las especies *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *S. minuta* se encontraban distribuidas en la mayor parte de España, siendo menor su presencia en la cornisa cantábrica. En el sudeste peninsular describieron tres nuevas especies solo descritas en África con anterioridad (*P. alexandri*, *P. chabaudi* y *P. longicuspis*=*P. perniciosus*), así como *P. fortunatarum* y *S. fallax* como especies exclusivas del archipiélago canario, y la

presencia de *P. mascitti* en Cataluña. Posteriormente se hace referencia a nuevas especies, como *P. langeroni* descrita por diversos autores en Madrid y Zaragoza (Conesa-Gallego *et al.*, 1997; Lucientes *et al.*, 1994). Con estos datos, quedaría completo el mapa de distribución de los flebótomos en España. En suma, hasta el momento se han citado 13 especies de flebótomos en España, dos pertenecientes al género *Sergentomyia* y 11 al género *Phlebotomus* (Figura 7).

Las especies de flebótomos competentes para transmitir *L. infantum* en España son *P. perniciosus* y *P. ariasi* (Miró & Molina, 2006). *P. perniciosus* está ampliamente distribuido en zonas áridas, semiáridas y templadas de la Península Ibérica, mientras que *P. ariasi* está restringido a zonas más húmedas, frescas y elevadas (Aransay *et al.*, 2004; Ballart *et al.*, 2012). Respecto a la tasa de infección de los flebótomos por *L. infantum* en España, obtenida mediante disecciones y aislamiento posterior del parásito, ésta oscila entre un 0,4% y un 4,6% en especímenes capturados en Tarragona, Almería, Zaragoza, Madrid, Mallorca, Ibiza y Formentera (Miró & Molina, 2006; Morillas-Márquez *et al.*, 1991 y 1996). Si se determina la presencia de *L. infantum* en los flebótomos mediante técnicas moleculares estos valores aumentan hasta un 38,7%-58,5%, tal y como han descrito diversos autores en estudios de focos activos de leishmaniasis (Alcover *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2013).

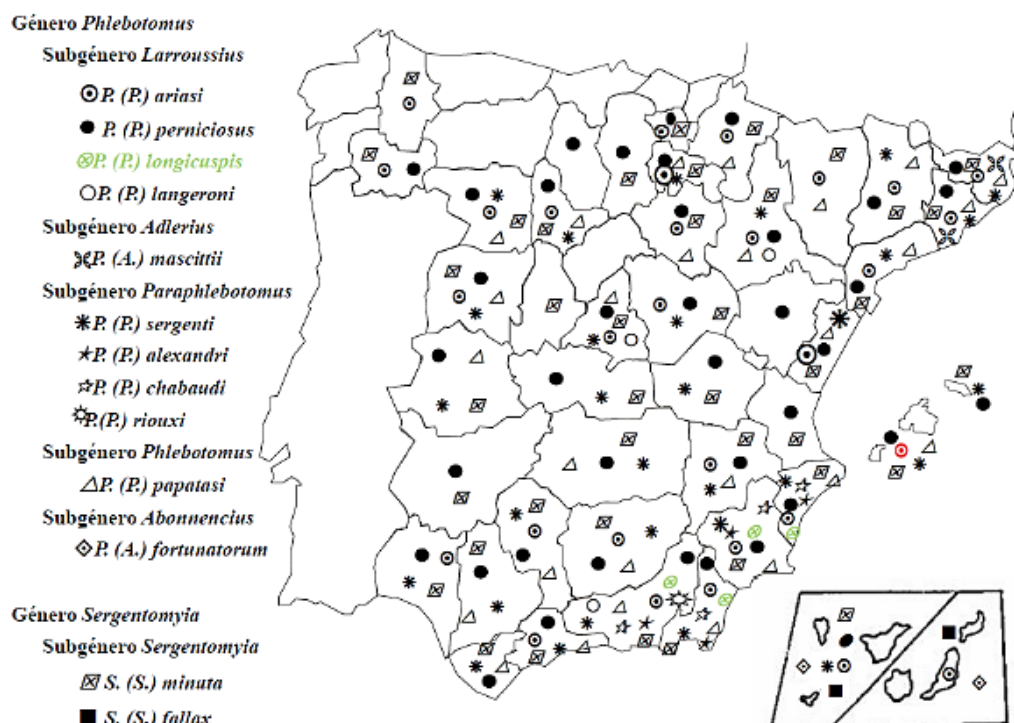


Figura 7. Distribución de los flebótomos en España En verde se señalan las especies de flebótomos que coinciden en morfología con *P. perniciosus*; en rojo: especie dudosa de *P. ariasi* según las citas bibliográficas (Alcover, 2014).

Tabla 3. Especies de flebótomos vectores, probados o sospechosos*, de *L. infantum*, *L. tropica* y *L. major* en la cuenca mediterránea y regiones aledañas (basado en Alcover, 2014; Maroli *et al.*, 2013; Ready, 2010).

Especie de vector	Distribución	Especie de Leishmania
Subgénero Larroussius		
<i>P. perniciosus</i>	Andorra, Alemania, Argelia*, Bulgaria, Croacia, <u>España*</u> , Francia*, Italia*, Malta*, Marruecos, Mónaco, Portugal*, Suiza, Túnez	<i>L. infantum</i>
<i>P. ariasi</i>	Andorra, Argelia, <u>España*</u> , Francia*, Italia, Marruecos, Portugal*, Túnez	<i>L. infantum</i>
<i>P. longicuspis</i>	Argelia, Marruecos, Túnez, <u>España</u>	<i>L. infantum</i>
<i>P. perfiliewi</i>	Albania, Argelia*, Bosnia, Croacia, Chipre, Francia, Georgia, Grecia, Hungría, Israel, Italia*, Malta, Marruecos, Montenegro, Palestina, República de Macedonia, Rumania, Serbia, Túnez, Turquía, Ucrania	<i>L. infantum</i>
<i>P. neglectus</i>	Albania*, Chipre, Croacia, Eslovenia, Grecia*, Hungría, Italia, Kosovo, Malta, Montenegro, República de Macedonia, Rumania, Serbia, Turquía, Ucrania	<i>L. infantum</i>
<i>P. tobbi</i>	Albania*, Croacia, Chipre*, Grecia, Irán, Israel, República de Macedonia, Siria, Turquía	<i>L. infantum</i>
<i>P. langeroni</i>	Egipto*, <u>España</u> , Francia, Túnez*	<i>L. infantum</i>
Subgénero Phlebotomus		
<i>P. papatasi</i>	Afgánistan* Argelia*, Azerbaiyán, Egipto*, <u>España</u> , Irán, Irak, Israel, Jordania, Libia, Marruecos, Omán, Pakistán, Palestina, Arabia Saudí, Sudán, Siria, Túnez*, Turkmenistán*, Uzbekistán, Yémen	<i>L. major</i>
<i>P. bergeroti</i>	Burkina Faso, Chad, Egipto, Irán, Mauritania, Omán, Yémen	<i>L. major</i>
Subgénero Paraphlebotomus		
<i>P. sergenti</i>	Afgánistan*, Argelia*, Azerbaiyán, Etiopía*, Grecia, Irán, Irak, Israel, Jordania, Libia, Marruecos*, Pakistán, Palestina, Arabia Saudí, Siria, Túnez*, Turquía, Turkmenistán, Uzbekistán, Yémen	<i>L. tropica</i>
<i>P. alexandri</i>	China, Irán, Irak, Omán	<i>L. donovani/L. infantum</i>
<i>P. chabaudi</i>	Marruecos, Túnez	<i>L. tropica</i>
Subgénero Adlerius		
<i>P. balcanicus</i>	Armenia, Georgia*	<i>L. infantum</i>

*Países donde se ha probado la especie de vector (de acuerdo a los criterios de incriminación). En los demás países se sospecha la especie de vector en base a la evidencia epidemiológica o porque es un vector probado en otros países.

1.4.2. Reservorios

Se considera que un animal es reservorio de una enfermedad cuando garantiza la existencia del agente etiológico y facilita su posterior transmisión, manteniendo de esta manera la población parasitaria a largo plazo (WHO, 2010). Conviene saber que la sola presencia de infección por *Leishmania* en una especie animal no necesariamente indica que esta sea un reservorio, la definición de reservorio implica: estar presente en abundancia en el foco de leishmaniasis, ser suficientemente longevo como para garantizar la transmisión, permitir el contacto con el vector, contener suficientes parásitos en piel o sangre para que puedan pasar al flebótomo, existir una proporción considerable de individuos parasitados y estar infectados de manera perdurable de una época de transmisión a la siguiente (WHO, 2010).

Normalmente, existe un único reservorio principal para una determinada especie de *Leishmania* en un foco en particular, a partir del cual tanto el humano como otros mamíferos pueden resultar infectados accidentalmente, actuando estos últimos como hospedadores secundarios y contribuyendo a mantener el foco endémico. En la mayor parte de los casos la leishmaniasis se mantiene en un ciclo selvático con la participación de reservorios salvajes y los flebótomos del ambiente. Por sinantropía, bien vector o reservorio pueden hacer que el ciclo se aproxime al ámbito peridoméstico, para finalmente arraigarse en el entorno doméstico. Las leishmaniasis pueden ser zoonóticas, cuando el reservorio es un animal (doméstico, peridoméstico o silvestre) o antropónicas cuando los humanos actúan como únicos reservorios (Alvar, 2001; WHO, 2010).

1.4.3. Reservorios de *L. infantum* en la región mediterránea

1.4.3.1. El perro

La leishmaniasis canina (LCan) por *L. infantum* tiene una gran importancia en Europa en salud pública y veterinaria (Gramiccia & Gradoni, 2005). El perro (*Canis familiaris*) está reconocido como el principal reservorio del ciclo doméstico y peridoméstico de la infección por *L. infantum* (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Se estima que en Europa pueden haber 2,5 millones de perros infectados en una población de 15 millones, lo que se traduce en una prevalencia de 16,7% (Moreno & Alvar, 2002; Pennisi, 2015).

No obstante, los distintos estudios epidemiológicos llevados a cabo en la región mediterránea muestran una prevalencia muy variable dependiendo de la zona de estudio y la técnica utilizada

(Morales-Yuste *et al.*, 2012). La mayoría de estas investigaciones se basan en el empleo de métodos de diagnóstico serológicos, y reportan prevalencias del 5% al 30% (Acedo-Sánchez *et al.*, 1998; Baneth *et al.*, 2008; Fisa *et al.*, 1999; Miró *et al.*, 2012; Morillas-Márquez *et al.*, 1996; Solano-Gallego *et al.*, 2009), si bien en algunos focos de Grecia la tasa de infección puede llegar al 70% (Leontides *et al.*, 2002; Solano-Gallego *et al.*, 2001) o incluso elevarse al 90% en el Sur de Francia (Berrahal *et al.*, 1996). Por otra parte, la utilización de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR – “*polymerase chain reaction*”) ha mostrado que la prevalencia de infección por *Leishmania* en perros, incluyendo infección asintomática, es bastante más elevada de lo que se creía; un estudio en el sur de Francia reportó mediante PCR una tasa de infección del 80% en perros seronegativos (Berrahal *et al.*, 1996; Leite *et al.*, 2015; Solano-Gallego *et al.*, 2001).

En los últimos años se está registrando una propagación de la LCan hacia el norte de Europa, tanto dentro de países endémicos como hacia países previamente no endémicos. Esta expansión parece que está asociada a la propagación de los flebótomos, donde los cambios ambientales están propiciando el asentamiento de nuevas poblaciones de estos vectores en estas regiones (ver más adelante en Figura 18). Un ejemplo paradigmático es la propagación de la leishmaniasis hacia el norte de Italia, donde la aparición de casos de leishmaniasis en humanos se asoció con la propagación de poblaciones de *P. perniciosus* y *P. neglectus* y la emergencia de LCan (Baldelli *et al.*, 2011; Maroli *et al.*, 2008). En los últimos años, también se han reportado casos de LCan en, Hungría y Alemania (Farkas *et al.*, 2011; Maroli *et al.*, 2008; Naucke *et al.*, 2016). Otro factor que facilita la expansión de la LCan es la llegada y la presencia de un considerable número de perros infectados a las áreas libres de la enfermedad. Estos casos importados representan un riesgo importante en la introducción, ya que constituyen la fuente de parásitos para iniciar el ciclo de transmisión. Se calcula que más del 3% de los perros que viajan desde el norte al sur de Europa en verano regresan infectados por *L. infantum* a sus hogares de origen (Shaw *et al.*, 2009). Por otra parte, es importante considerar la adopción de perros de áreas endémicas, en los que la infección por *Leishmania* puede pasar inadvertida si no se realizan los controles veterinarios adecuados (Baneth *et al.*, 2008; Kaszak *et al.*, 2015; Solano-Gallego *et al.*, 2009). La LCan es una enfermedad de declaración obligatoria en Europa según las indicaciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Sin embargo, existe un alto porcentaje de animales infectados sin ser declarados o peor aún no diagnosticados (Dujardin *et al.*, 2008; Kaszak *et al.*, 2015; Miró *et al.*, 2012).

En España, la LCan se extiende prácticamente en todo el territorio peninsular e Islas Baleares coincidiendo con la distribución de las dos especies de flebótomos que son los principales transmisores: *P. perniciosus* y *P. ariasi*. En la región de Madrid se ha estimado una

seroprevalencia media del 7.8% en perros callejeros y del 8.1% en perros con dueño (Gálvez *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2007, 2013). A pesar de que el perro es el principal reservorio de *L. infantum* en la Península Ibérica y Baleares, en la región de Madrid no se detectó un incremento de la seroprevalencia en perros del área asociada al brote de leishmaniasis cutánea y visceral que afectó a los habitantes del suroeste de la Comunidad Autónoma de Madrid entre 2009-2012 (Arce *et al.*, 2013). Esto probablemente pueda deberse a la promoción de medidas de prevención de la LCan por parte de los veterinarios, aconsejando la utilización de medidas de control como collares o pipetas repelentes y/o insecticidas (Miró *et al.*, 2013). En el contexto del brote, este hecho llevó a pensar que el perro probablemente no era el principal implicado en la transmisión de la leishmaniasis (Carrillo *et al.*, 2013).

1.4.3.1.1. Leishmaniasis canina: manifestaciones clínicas

El seguimiento de diferentes cohortes de perros ha mostrado que, incluso con tasas elevadas de infección, la enfermedad sólo se manifiesta en una proporción limitada de perros. En áreas endémicas, un número elevado de perros tendrá anticuerpos específicos anti-*Leishmania* sin manifestar ningún signo de LCan (Figura 8). Por otra parte, encontraremos un grupo importante de perros asintomáticos y seronegativos, pero en los que la infección puede detectarse mediante PCR, pudiendo ser este caso más frecuente que los dos anteriores. La información obtenida en estudios de seguimiento muestra que la mayoría de los perros con infección asintomática terminará por desarrollar LCan a corto o medio plazo (Baneth *et al.*, 2008). Por último, un perro puede cambiar de categoría durante su vida de acuerdo a la respuesta inmune y/o exposición provocada por el parásito, lo que indica que el periodo de incubación de la LCan puede variar de meses a años.

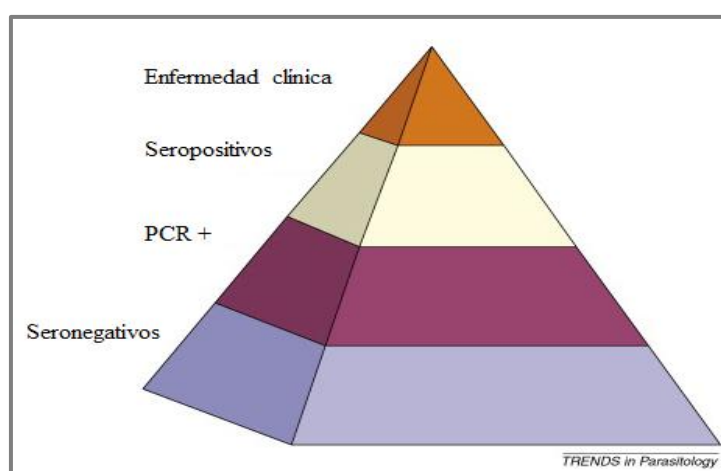


Figura 8. Representación esquemática de la distribución de LCan e infección por *Leishmania* en la población canina en un foco endémico. Imagen Adaptada de Baneth *et al.*, (2008).

El cuadro clínico de la LCan es muy variable y puede cursar con afectación multisistémica, mostrando signos clínicos cutáneos y/o viscerales de manera concomitante (Solano-Gallego *et al.*, 2011). El curso de la infección por *Leishmania* en perros está ligado tanto a la respuesta inmune del hospedador como a la capacidad de persistencia y multiplicación del parásito, de los cuales dependerá los síntomas y la severidad del cuadro (Baneth *et al.*, 2008).

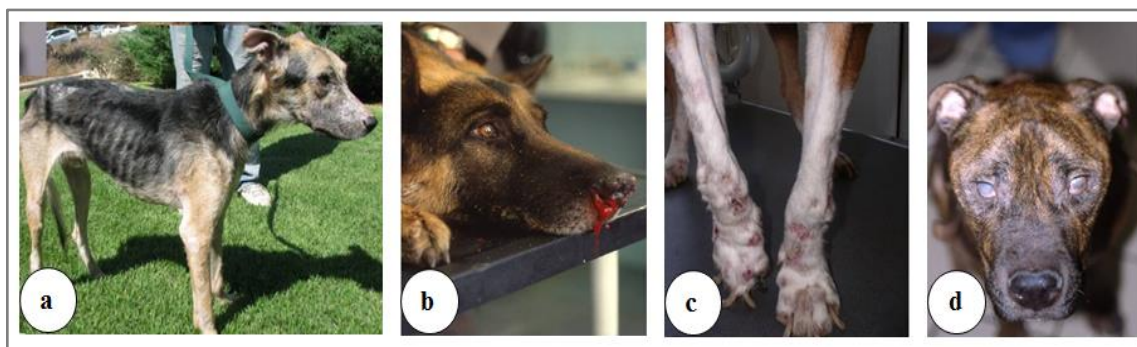


Figura 9. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis canina: (a) caquexia y lesiones faciales con dermatitis exfoliativa, (b) epistaxis, (c) onicogriposis, (d) alteraciones oculares: uveítis bilateral y opacidad de la córnea. Imágenes tomadas de Baneth *et al.*, (2008) y Solano-Gallego *et al.*, (2011).

Las lesiones cutáneas de la LCan pueden ser localizadas o generalizadas. En cuanto a los trastornos debidos a la visceralización, la mayoría tiene una presentación inespecífica, como caquexia, atrofia muscular generalizada, astenia, inapetencia, linfadenomegalia, epistaxis, anemia, dermatitis y onicogriposis, entre otros (Figura 9). Otros síntomas observados, como son hepatomegalia, esplenomegalia, alteraciones oculares, poliartritis, hemorragias y disfunción renal, suelen ir asociados a casos fatales de LCan (Alvar *et al.*, 2004; Baneth *et al.*, 2008; Pennisi, 2015; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

1.4.3.2. Reservorios alternativos de *L. infantum*

Si bien se considera al perro como reservorio principal de *L. infantum* en la región mediterránea, la infección en otros animales, tanto domésticos como salvajes, ha sido objeto continuo de estudio. El gato (*Felis catus*) ha atraído la atención de muchos investigadores debido al aumento de la seroprevalencia de la infección por *Leishmania* en este animal en países como España, Italia y Portugal (Ayllon *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2008; Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Miró *et al.*, 2014; Pennisi *et al.*, 2013). A pesar de la susceptibilidad a ser infectados por *L. infantum* y el hecho de estar en la misma zona del ciclo de transmisión doméstico y/o peridoméstico, tal y como sucede con el perro, el papel del gato como reservorio aún no se ha

determinado de forma concluyente (Maia & Campino, 2011), si bien se ha demostrado que puede ocurrir la transmisión de *L. infantum* desde un gato infectado al vector *P. perniciosus* (Maroli *et al.*, 2007). En España se han obtenido prevalencias de infección por *Leishmania* en gatos que oscilan entre 1,7% al 6,29% utilizando técnicas serológicas, y hasta del 26,1% empleando técnicas moleculares (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007). Por otra parte, la posibilidad de que ciertos animales silvestres puedan actuar como reservorios no domésticos de *L. infantum* ha llevado en los últimos años al estudio de la prevalencia de infección por *Leishmania* en estos hábitats. Como se aprecia en la Tabla 4, los zorros, roedores y otros animales silvestres han sido referidos como posibles reservorios en diversos estudios (Tabla 4 y Figura 10).

Tabla 4. Detección de *Leishmania*, presumiblemente *L. infantum*, en animales silvestres.

Reservorio	País	Referencia
Zorros (<i>Vulpes vulpes</i>)	España	(Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2000) (Marín-Iniesta <i>et al.</i> , 1982)
	Francia	(Rioux <i>et al.</i> , 1968)
	Portugal	(Abranches <i>et al.</i> , 1983)
Ratas (<i>Rattus rattus</i>) y otros roedores	España	(Morillas-Márquez <i>et al.</i> , 1985) (Navea-Pérez <i>et al.</i> , 2015)
	Italia	(Bettini <i>et al.</i> , 1978)
	Grecia	(Papadogiannakis <i>et al.</i> , 2010)
Tejones (<i>Meles meles</i>), ginetas (<i>Geneta geneta</i>), martas (<i>Martes foina</i>), hurones (<i>Mustela putorius</i>)	España	(Morillas-Márquez <i>et al.</i> , 1985) (Botet-Fregola & Portús-Vinyeta, 1993) (Fisa <i>et al.</i> , 1999) (Portús <i>et al.</i> , 2003) (Martín-Sánchez <i>et al.</i> , 2004) (Millán <i>et al.</i> , 2011)
Lobos (<i>Canis lupus</i>), mangostas (<i>Herpestes ichneumon</i>), lince ibérico (<i>Lynx pardinus</i>)	España	(Sobrino <i>et al.</i> , 2008) (Del Rio <i>et al.</i> , 2014)
Liebres (<i>Lepus granatensis</i>)	España	(Molina <i>et al.</i> , 2012) (Jiménez <i>et al.</i> , 2014)
Conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	España	(Chitimia <i>et al.</i> , 2011) (Jiménez <i>et al.</i> , 2014) (García <i>et al.</i> , 2014)
Caballos (<i>Equus caballus</i>)	España	(Fernández-Bellón <i>et al.</i> , 2006) (Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2003)
Erizos (<i>Erinaceus europaeus</i>)	España	(Muñoz-Madrid <i>et al.</i> , 2013)
Macropódidos (Canguros Ualabí)	España	(Montoya <i>et al.</i> , 2016) (Ramírez <i>et al.</i> , 2013)

En el contexto del reciente brote de leishmaniasis en la Comunidad Autónoma de Madrid, se ha comprobado que tanto la liebre (*Lepus granatensis*) como el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) tienen tanto la capacidad de infectarse por *L. infantum* como la de transmitir la infección a vectores como *P. perniciosus* (Jiménez *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2012). Distintos estudios han detectado ADN de *L. infantum* en bazo y/o piel del 29% de las liebres y hasta 21% de los conejos

capturados en la zona del brote (García *et al.*, 2014; Vilas, 2017). Por otra parte, los estudios serológicos realizados en el mismo área muestran seroprevalencias del 74% en liebres y hasta del 45,7% en conejos (García *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2014) Un estudio que analizó una muestra de diferentes regiones de España mostró que hasta en el 43% de las liebres estudiadas se detecta ADN de *Leishmania* (Ruiz-Fons *et al.*, 2013). La existencia de altas tasas de infección por *L. infantum* en carnívoros salvajes y otros animales ya mencionados, sugiere la existencia de un ciclo silvestre independiente del perro, como sería el caso del brote de leishmaniasis de Madrid, con las liebres actuando como reservorios (Molina *et al.*, 2012; Vilas, 2017).

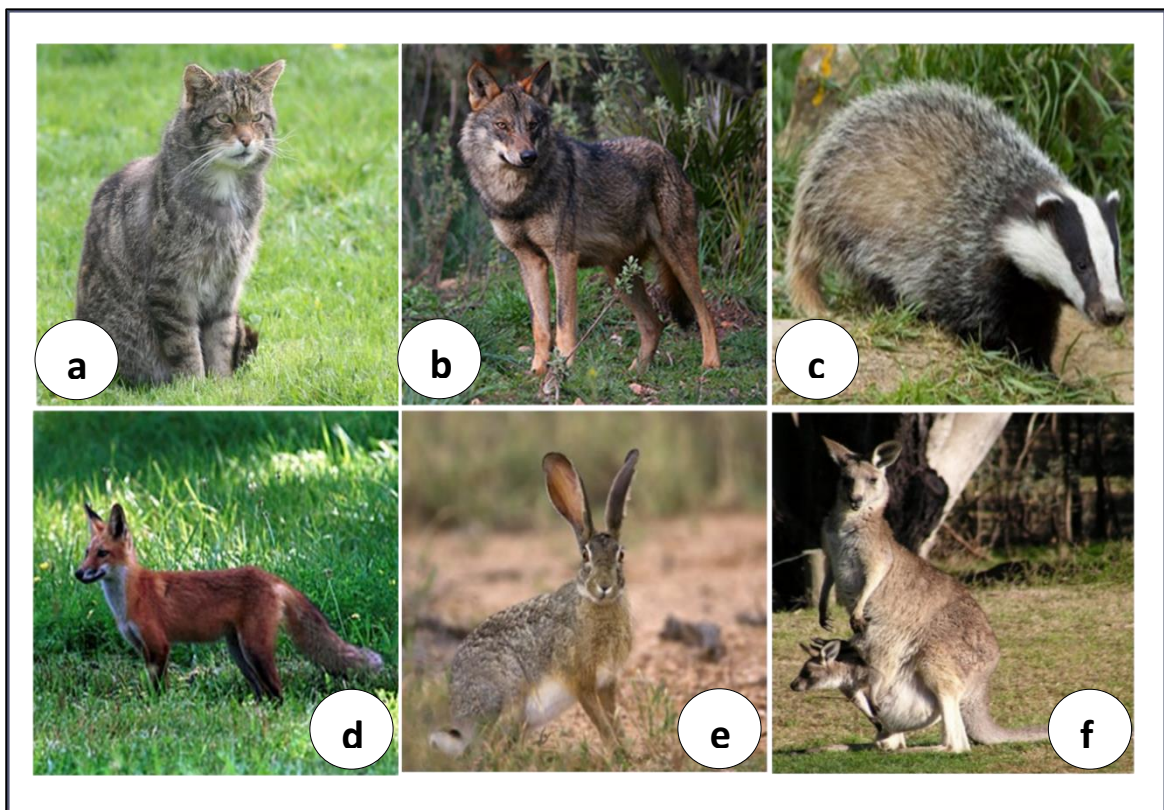


Figura 10. Reservorios alternativos de *L. infantum*. a) Gato: *Felis catus*, b) Lobo: *Canis Lupus*, c) Tejón: *Meles meles*, d) Zorro: *Vulpes vulpes*, e) Liebre: *Lepus granatensis* f) Canguro Ualabí: *Macropus rufus*.

1.5. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis humana

La infección en humanos por parásitos del género *Leishmania* produce un amplio espectro de manifestaciones clínicas, conocidas globalmente como leishmaniasis. La mayoría de las infecciones por *Leishmania* cursan de manera asintomática, jugando la respuesta inmune ante el parásito un papel importante en el desarrollo de la infección (Antinori *et al.*, 2012; Gallego, 2004; WHO, 2010). Las posibles manifestaciones clínicas, que pueden variar desde lesiones cutáneas localizadas de resolución espontánea a formas viscerales fatales, son por lo general dependientes de la especie de *Leishmania* causante de la infección, como se describe en la Tabla 5 (Herwaldt, 1999; WHO, 2010).

Tabla 5. Detalle de las principales especies de *Leishmania* de interés médico y las principales manifestaciones clínicas a las que se asocian. No se consideran las manifestaciones clínicas en sujetos co-infectados con el VIH (Tomada de Llanes-Acevedo *et al.*, 2015).

Región	Sub-region	Especie	Manifestación clínica
Viejo Mundo	Centro, Norte y Este de África; Oriente Medio	<i>L. major</i>	LC
	Norte y Este de África; Grecia; Oriente Medio; Subcontinente Indio	<i>L. tropica</i>	LC, LCR
	Este de África	<i>L. aethiopica</i>	LC, LCD
	Cuenca Mediterránea; Oriente Medio; Algunas regiones de centro-Asia y China	<i>L. infantum</i>	LC, LV
	Este de África, y Subcontinente Indio	<i>L. donovani</i>	LC*, LMC*, LV, LDPK"
Nuevo Mundo	Norte ^a y Centro América; Sur de Sudamérica	<i>L. mexicana</i>	LC
	Centro América y Norte de Sudamérica	<i>L. amazonensis</i>	LC, LCD
	Centro y Sur América	<i>L. braziliensis</i>	LC, LMC
	Centro y Sur América	<i>L. guyanensis</i>	LC, LMC
	Norte, Centro y Sur América	<i>L. infantum</i> (syn. <i>L. chagasi</i>)	LC, LV

*Tan sólo en Sudán se ha descrito la implicación de *L. donovani* en casos de LC y LMC, no así en otras regiones del este de África o el subcontinente indio, donde esta especie es endémica. "La LDPK es una manifestación dérmica que en ocasiones sigue a un episodio de LV; se considera que los pacientes de LDPK pueden actuar como reservorio entre epidemias de LV"; Cuando se indica Norte América se hace referencia tan sólo al sur de los EEUU.

La forma clínica más común es la **leishmaniasis cutánea (LC)**. Todas las especies de *Leishmania* pueden causar LC. No obstante, la mayoría de los casos se asocian a infecciones por *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica* en el Viejo Mundo, y *L. mexicana*, *L. braziliensis*, y otras especies relacionadas en el Nuevo Mundo (Reithinger *et al.*, 2007). Se afectan principalmente las regiones expuestas del cuerpo y la manifestación inicial suele ser una pápula localizada en la zona de inoculación de los promastigotes, que posteriormente se convierte en un nódulo y que finalmente puede ulcerar tras 1 a 3 meses de evolución (Dowlati, 1996; Machado *et al.*, 2002; Salman *et al.*, 1999). La mayoría de los casos de LC, cursan con curación espontánea, si bien esta puede requerir de meses o años (Reithinger *et al.*, 2007).



Figura 11. LC. Imágenes: WHO; Mateo *et al.*, 2005.

La **leishmaniasis mucocutánea (LMC)** por lo general ocurre meses o años después de la curación de una LC primaria, con mayor frecuencia se asocia a la infección por *L. braziliensis* u otras especies del subgénero *Viannia*. La LMC puede causar la destrucción del tabique nasal, paladar y otras estructuras de la mucosa, causando una mutilación facial devastadora y, en casos muy extremos, la muerte al favorecerse el desarrollo de sobreinfecciones (Reithinger *et al.*, 2007; Strazzulla *et al.*, 2013). Aunque es más común en el continente americano, existen casos esporádicos por *L. infantum* en pacientes inmunosuprimidos (Murray *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2015).



Figura 12. LMC. Imagen: WHO

Otras formas de evolución complicada de la LC son la **leishmaniasis cutánea difusa (LCD)**, y la **leishmaniasis cutánea recidivante (LCR)**. La LCD es un tipo de lesión no ulcerosa caracterizada por una infiltración difusa de la piel, con lesiones en forma de placa o nodulares que no cicatrizan y progresan lentamente. Se asocia a estados de anergia (Barral *et al.*, 1995). Es causada por la especie *L. aethiopica* en el Viejo Mundo y por *L. amazonensis* en el Nuevo Mundo. La LCR es una forma cutánea crónica debida generalmente a *L. tropica* (Hepburn, 2003). Son lesiones vesiculares y/o papulares que aparecen después de la cura clínica alrededor de la lesión principal y que persisten durante varios años. Ambas formas son raras, difíciles de tratar y pueden llegar a ser graves.



Figura 13. LCR. Imagen: WHO

La **leishmaniasis visceral** (LV) es la forma más severa de la enfermedad, afectando órganos hematopoyéticos (hígado, bazo y médula ósea), causando graves disfunciones orgánicas y de fatal desarrollo si no se trata (Alvar *et al.*, 2008; Desjeux, 2001). La mayoría de las infecciones son asintomáticas (Biglino *et al.*, 2010; Michel *et al.*, 2011), pero la malnutrición y la inmunosupresión, principalmente la coinfección con el VIH, son factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad clínica (WHO, 2010). *L. donovani* es la especie causante de LV antroponótica (LVA) o “Kala-azar” en el subcontinente indio, y África oriental (tanto en



Figura 14. LV (*L. donovani*) en la India. Hepatoesplenomegalia evidente. Imágen: Murray *et al.*, 2005

adultos como en niños), mientras que *L. infantum*, causa la llamada leishmaniasis visceral zoonótica (LVZ) en la cuenca mediterránea, norte de África, Oriente Medio, Asia central, China y América Latina. En ambos casos la enfermedad se caracteriza por fiebre progresiva, pérdida de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, hipergammaglobulinemia, y pancitopenia. Las complicaciones suelen ser infecciones bacterianas secundarias, hemorragias, anemia severa, caquexia, ictericia y, cuando el kala-azar se produce durante el embarazo, la muerte fetal o la leishmaniasis congénita (Pagliano *et al.*, 2005).

La **leishmaniasis dérmica post-kala-azar** (LDPK) es una complicación frecuente de la LV causada por *L. donovani* en el subcontinente indio y en África oriental, y generalmente se observa en pacientes que han superado un episodio de LV o que están finalizando el tratamiento (Ramesh & Mukherjee, 1995; Zijlstra *et al.*, 2003). Los pacientes con LDPK presentan máculas eritematosas o hipopigmentadas, algunas veces progresando a placas o nódulos (Zijlstra *et al.*, 2003). En Sudán, aproximadamente en la mitad de los pacientes, la LDPK se manifiesta en menos de 6 meses desde el episodio de LV, y suele curar espontáneamente en menos de 12 meses, siendo necesario el tratamiento solo en determinados episodios. Mientras que en India se desarrolla en el 5-10% de los pacientes, años después del episodio de LV, no cura y en la mayoría de los casos necesita tratamiento. Los pacientes con LDPK se consideran de riesgo epidemiológico, ya que las lesiones pueden contener una alta carga de parásitos que podrían transmitirse a los flebotomos.



Figura 15. LDPK con máculas hipopigmentadas. Imágen: WHO



Figura 16. DPK con lesiones micropapulares. Imágen: Médicos Sin Fronteras.

Es importante señalar que las distintas manifestaciones clínicas de la leishmaniasis son resultado de la interacción de diversos factores, tanto de la especie del parásito, como la respuesta inmune desarrollada por el sujeto infectado, su genética, y el contexto endémico (Murray *et al.*, 2005; Weigle & Saravia, 1996; WHO, 2010). El ejemplo más evidente del papel del sistema inmune en el desenlace de la infección por *Leishmania* es el de la coinfección *L. infantum*/VIH. Si bien *L. infantum* se ha considerado siempre como responsable de LC y LV exclusivamente, en los sujetos co-infectados con el VIH se han podido observar toda una serie de cuadros clínicos que, en principio, tan sólo se relacionaban con otras especies de *Leishmania*, como la LCD, LCR, LMC, o LDPK. Además, el desarrollo de la LV también se ve alterado en enfermos co-infectados con VIH, presentando tanto una mayor tasa de fracaso terapéutico como un mayor número de recaídas (Alvar *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2006).

2. EMERGENCIA Y RE-EMERGENCIA DE LA LEISHMANIASIS EN EUROPA

En Europa se reportan más de 700 casos autóctonos de LC y LV cada año (y hasta 3.950 si se incluye a Turquía). La incidencia de la LV zoonótica, causada por *L. infantum*, es relativamente baja en humanos, oscilando entre 0,02 a 0,49 casos/100.000 habitantes (8,53/100.000 incluyendo a Turquía) (Alvar *et al.*, 2012; Dujardin *et al.*, 2008).

En el sur de Europa la LV se consideraba principalmente una enfermedad pediátrica y restringida al ámbito rural y periurbano. Sin embargo, desde los años ochenta, y coincidiendo con la aparición de la epidemia de VIH/SIDA, el patrón epidemiológico de la LV sufrió un cambio importante, principalmente en España, Francia, Italia y Portugal, reportándose un aumento en el número de casos en población adulta, como consecuencia de la coinfección con VIH (Alvar *et al.*, 2008; Gil-Prieto *et al.*, 2011; Monge-Maillo *et al.*, 2014). Afortunadamente, con la introducción de las terapias antirretrovirales de gran actividad a partir de 1997, se observó una reducción del 35-40% en el número de casos de coinfección *Leishmania*/VIH (Alvar *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2006).

Existen otras tres especies causantes de leishmaniasis en la cuenca mediterránea: *L. major*, que está presente en el Norte de África y Oriente Medio, y causa LC; *L. tropica*, que se encuentra en Grecia, Turquía, Oriente Medio y el norte de África, causando LC (Ready, 2010; WHO, 2010); y recientemente se han descrito en Chipre y Turquía casos de LC y LV debidos a *L. donovani* (Antonioni *et al.*, 2009; Mazeris *et al.*, 2010).

En los últimos años, se describe cada vez con mayor frecuencia la emergencia de pequeños y grandes brotes de leishmaniasis en distintos países europeos, junto con un incremento de la prevalencia en algunas áreas endémicas y propagación hacia el norte (Amusatogui *et al.*, 2004; Dujardin *et al.*, 2008; Gálvez *et al.*, 2010; Maroli *et al.*, 2008; Martín-Sánchez *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2012; Morosetti *et al.*, 2009). En la mayoría de los casos en entornos periurbanos y urbanos, probablemente como consecuencia del contacto con ciclos rurales y silvestres (Biglino *et al.*, 2010; Ready, 2008). Por otra parte, uno de los factores claves en la introducción de nuevos focos de leishmaniasis ha sido el efecto del calentamiento global, que permitiría a los flebótomos colonizar hábitats más septentrionales, así como acortar el periodo de desarrollo y extender la temporada generacional de las especies de flebótomos propios de la zona (Dereure *et al.*, 2009).

Los países europeos considerados tradicionalmente endémicos son aquellos situados al suroeste, como Portugal, España, Francia, Italia y Grecia, caracterizados por veranos secos y cálidos e inviernos templados que favorecen el mantenimiento de las poblaciones de flebótomos (Ferroglio *et al.*, 2005). No obstante, en los últimos años los casos autóctonos no parecen estar limitados a la región mediterránea, algunos ejemplos de la nueva dinámica de la leishmaniasis en Europa son (Figura 17):

- i) la propagación hacia el norte de la leishmaniasis humana y canina en Italia y el brote de leishmaniasis visceral en la provincia de Bolonia en 2012-2013 (Biglino *et al.*, 2010; Gramiccia *et al.*, 2013; Maroli *et al.*, 2008; Varani *et al.*, 2013);
- ii) la detección de vectores y primeros casos de transmisión autóctona de *L. infantum* en perros en Hungría, que hasta la fecha se consideraba un país libre de leishmaniasis (Farkas *et al.*, 2011; Tánzos *et al.*, 2012);
- iii) la emergencia de LC y LV en Chipre causada por *L. donovani*, especie que no se había reportado en Europa anteriormente (Antoniou *et al.*, 2009; Mazeris *et al.*, 2010); y
- iv) la sospecha de la inminente emergencia de leishmaniasis en el sur de Alemania, donde ya se ha demostrado la presencia de flebótomos vectores y los primeros casos autóctonos, constatando la propagación hacia el norte de Europa (Bogdan *et al.*, 2001; Mencke, 2011; Naucke *et al.*, 2008).

A este escenario se añaden el reciente hallazgo de flebótomos vectores, así como la infección por *L. infantum* en perros y carnívoros salvajes en la zona más septentrional de España (Del Rio *et al.*, 2014; Miró *et al.*, 2012). Además, encontramos el ejemplo más impactante en el brote urbano de leishmaniasis que afectó al suroeste de la Comunidad Autónoma de Madrid, un hecho sin precedentes en Europa, y que pudo tener su origen en una serie de alteraciones ambientales que

facilitaron la aproximación de un ciclo de transmisión silvestre al entorno urbano (Arce *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2013).

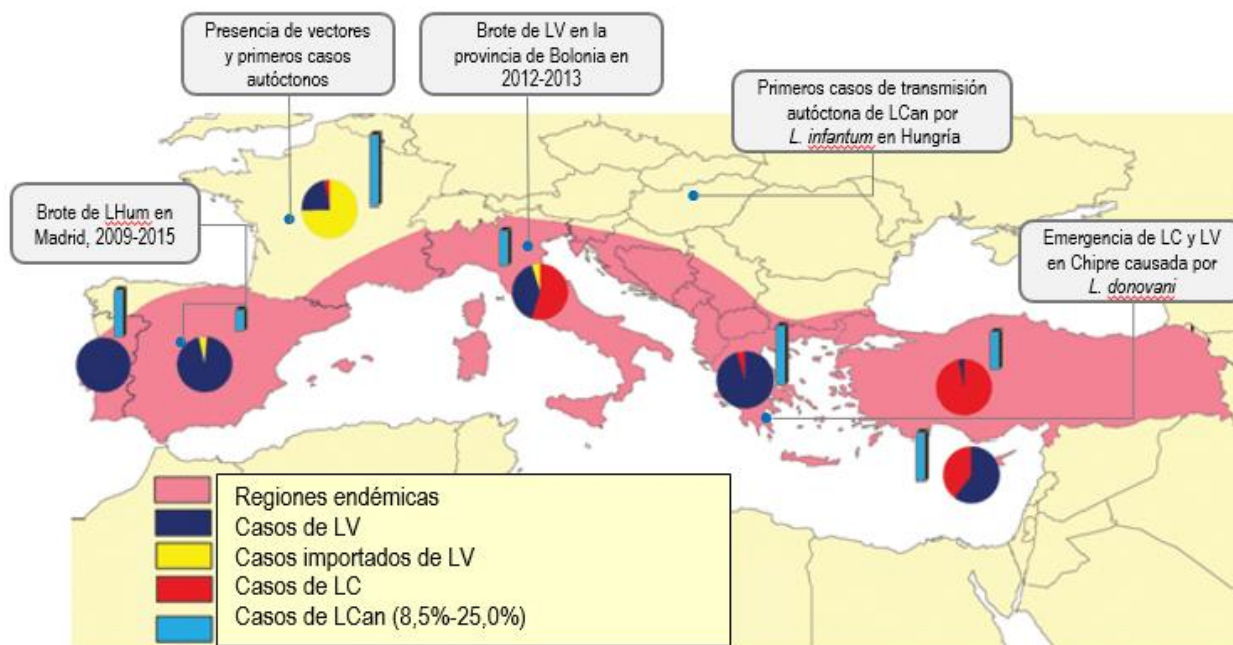


Figura 17. Actual situación epidemiológica de la leishmaniasis en Europa. Distribución por áreas endémicas, zonas de extensión y países con casos autóctonos confirmados Adaptado de Dujardin *et al.*, 2008.

Esta problemática de propagación de la leishmaniasis hacia el norte de Europa se asocia con diversos factores de riesgo como ya se ha mencionado. Sin embargo, no debe descartarse la introducción del parásito, en estos países, por medio de la importación de animales infectados (principalmente perros, gatos y otros animales domésticos), procedentes de áreas endémicas y que permitirían la infestación de los vectores (Naucke *et al.*, 2008; Reisen, 2010; Semenza & Menne, 2009), y que propiciado por los cambios ambientales han aumentado las poblaciones de flebótomos en estas zonas (Colwell *et al.*, 2011; Dereure *et al.*, 2009; Dufour *et al.*, 2008; González *et al.*, 2010; Jacob, 2008). Asimismo, podría sumarse las alteraciones ambientales de origen humano y grandes movimientos migratorios. Estos y otros factores que pueden influir en la (re-)emergencia de la leishmaniasis en Europa se muestran de modo esquemático en la Figura 18 y se describen de la siguiente manera:

1. **Propagación de LC y LV de zonas endémicas a zonas no endémicas:** propagación natural de *L. infantum* y *L. tropica* desde regiones donde son endémicas hacia áreas vecinas en las que ya existe el vector (Gramiccia & Gradoni, 2005; Ready, 2008; WHO, 2010).

2. **Elevada prevalencia de portadores asintomáticos:** se estima que por cada caso sintomático de LV existen alrededor de 30-100 casos con infecciones subclínicas (Pampiglione *et al.*, 1974). Estas infecciones asintomáticas podrían progresar a formas clínicas graves en situaciones de inmunodepresión, como en el caso de la epidemia de VIH/SIDA, una crisis de malnutrición, o el incremento en el uso de terapias inmunosupresoras (Antinori *et al.*, 2008; Desjeux & Alvar, 2003; Ibrahim *et al.*, 2013; Van Griensven *et al.*, 2014; Zanger & Gabrysch, 2013).
3. **Desplazamiento de reservorios a áreas no endémicas:** En España la seroprevalencia de infección por *L. infantum* en perros puede llegar al 34%. En Alemania se estima que hay unos 20.000 perros infectados por *L. infantum*, que bien son perros infectados importados desde regiones endémicas como España, o son perros que viajaron con sus dueños por turismo al sur de Europa, donde adquirieron la infección (Mencke, 2011; Naucke *et al.*, 2008). De este modo, la presencia de reservorios infectados, junto con el hallazgo de *P. perniciosus*, uno de los vectores más importantes de *L. infantum*, en países del centro de Europa como Suiza (Grimm *et al.*, 1993) o Alemania (Naucke & Schmitt, 2004), plantea la hipótesis de una posible emergencia de la enfermedad en latitudes donde tradicionalmente no existía.
4. **Introducción de especies exóticas (vectores y parásitos) en Europa:** Especies como *L. donovani* y *L. tropica*, podría colonizar vectores europeos, bien a través de los viajeros (humanos o perros domésticos) o inmigrantes de países endémicos. No obstante, la probabilidad de que estas especies puedan mantener un ciclo de transmisión en Europa es relativamente baja, pues sería fundamental que encontrasen reservorios y vectores locales que asegurasen la transmisión. No obstante, *L. donovani*, podría ser transmitido por una buena parte de las especies de flebótomos, mientras que *L. tropica* podría ser transmitida por *P. sergenti* (Afonso *et al.*, 2005).

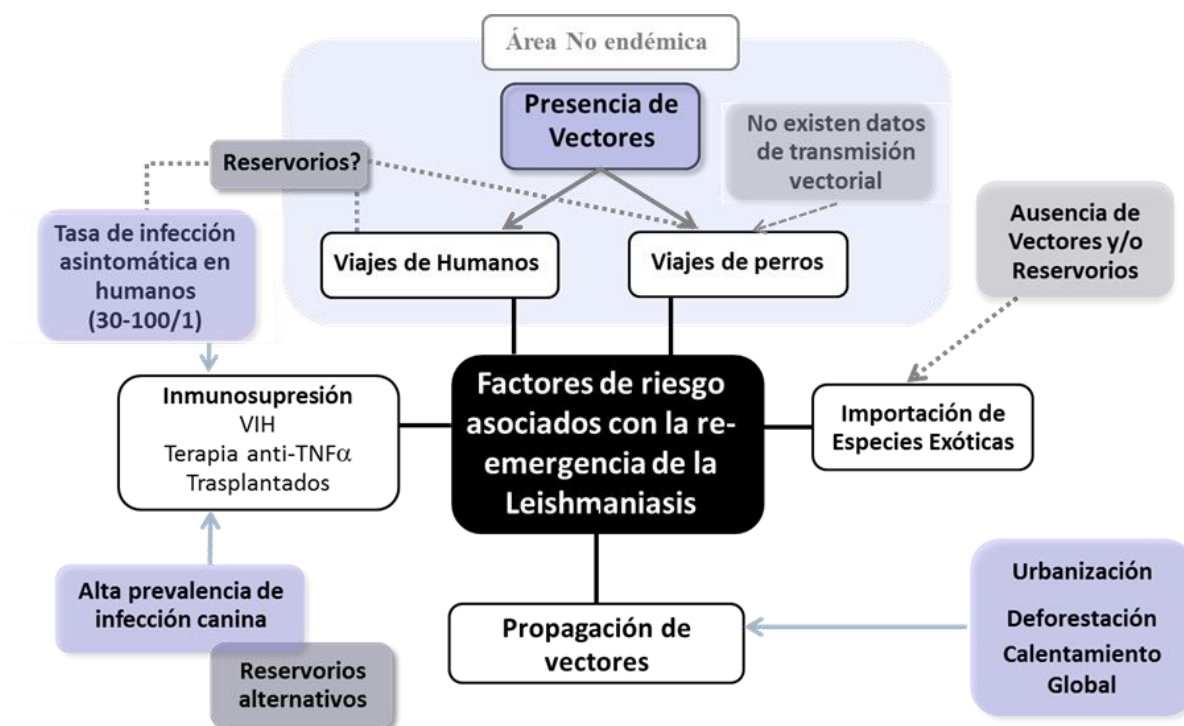


Figura 18. Factores de riesgo relacionados con la (re-)emergencia de la leishmaniasis en Europa.

3. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA LEISHMANIASIS HUMANA EN ESPAÑA

Los primeros casos de leishmaniasis humana y canina en España se describen en 1912 y 1913 por Gustavo Pittaluga en el área de levante (Pittaluga, 1912, 1913). En 1914, Camacho-Alejandre y Fernandez- Martínez realizan las primeras descripciones de la enfermedad en Andalucía. Desde entonces, se comenzó a registrar un constante, aunque no elevado número de casos. Estos no eran reportados de manera sistemática, y la información accesible se limita a un limitado número de series, estimándose unos dos mil casos de leishmaniasis entre el periodo de 1912 a 1947 para toda España y luego registros de pequeñas series, como la de Navalmoral de la Mata de 99 casos, descrita por Lozano Morales, o las 43 historias descritas por Cambronero Galache y colaboradores entre 1960 y 1980 en Madrid (Botet-Fregola & Portús-Vinyeta, 1993).

En 1982 se declara la leishmaniasis como Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) (B.O.E. nº13, 1982). Reportándose hasta 1.574 casos acumulados entre 1982 y 1996 (Alvar *et al.*, 1997;

Gil-Prieto *et al.*, 2011; Morillas-Márquez *et al.*, 1996). Es en este periodo cuando se describe el primer caso de leishmaniasis asociado a SIDA (De la Loma *et al.*, 1985), y cuando aumenta de manera importante el número de casos de leishmaniasis, principalmente asociados a coinfección con VIH (Alvar *et al.*, 2008, 1997). De los 1.911 casos de coinfección reportados oficialmente a la OMS desde el suroeste de Europa entre los años 1990-2001, 1.099 casos ocurrieron en España (Desjeux & Alvar, 2003), probablemente debido al solapamiento geográfico de ambas enfermedades.

Por otra parte, la elevada tasa, por encima de la media europea, de adictos a drogas por vía parenteral (ADVPs) en España sugirió la existencia de un ciclo de transmisión alternativo de carácter epidémico, antroponótico y artificial, en el que el hecho de compartir jeringuillas entre ADVPs facilitase la transmisión de *Leishmania*, contribuyendo al elevado número de casos de coinfección *Leishmania*/VIH en España, en comparación con otros países del suroeste de Europa (Alvar & Jiménez, 1994; Cruz *et al.*, 2006). En 1997, con la introducción de la terapia antiretroviral de gran actividad (TARGA) contra el VIH el número de casos de coinfección reportados en España descende de 1.099 en la década 1990-2001 a 130 en el periodo 2001-2006 (Alvar *et al.*, 2008), y hasta menos de 10 casos en 2008. Junto con el número de casos se redujo también el número recaídas y la mortalidad asociada a la coinfección *Leishmania*/VIH. Contribución tanto de la terapia TARGA como del tratamiento con anfotericina B contra la leishmaniasis (Gil-Prieto *et al.*, 2011; López-Vélez *et al.*, 2001).

En 1996 entra en vigor el Real decreto RD 2210/1995 y se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), que considera la leishmaniasis como una EDO tan solo en determinadas comunidades autónomas (Abellán-García *et al.*, 2005). Como consecuencia de la falta de un sistema de vigilancia centralizado, solo se notificaron los casos registrados en 12 de las 17 comunidades autónomas, pudiendo ser que las cifras reportadas a partir de 1996 no reflejen el número de casos real (Alvar *et al.*, 2012; Dujardin *et al.*, 2008). De modo que para tener una buena información sobre los casos de leishmaniasis humana en España es necesario consultar tanto la información recogida por la RENAVE como la disponible en el Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD), donde se puede acceder al número de altas hospitalarias entre cuyos diagnósticos principal o secundario figure esta enfermedad (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012).

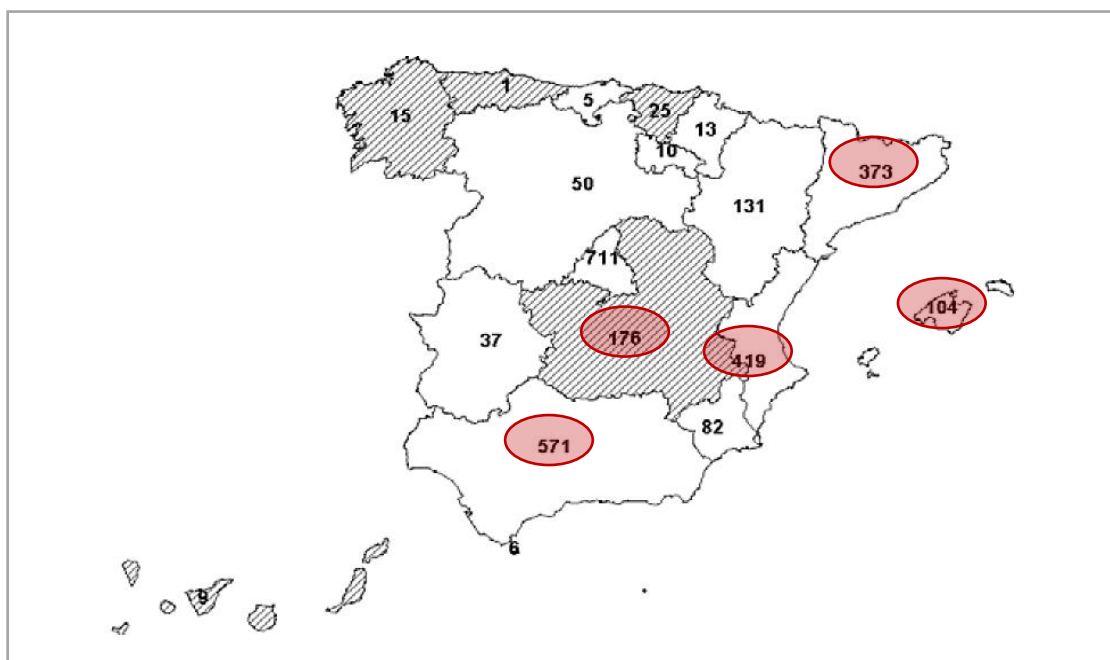


Figura 19. Representación geográfica del número de casos de leishmaniasis registrados en el CMBD entre 2000-2011 en España por CCAA. Las CCAA que aparecen sombreadas son las que no han notificado casos de leishmaniasis como EDO a la RENAVE. Las CCAA que aparecen señaladas en rojo son aquellas en las que se alcanzaron incidencias superiores a la media del país (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012).

En España la leishmaniasis está considerada como una enfermedad hipoendémica, y según la información de la RENAVE en las últimas dos décadas, se observa que las comunidades autónomas que han notificado casos son: Andalucía, Aragón, Cantabria, Castilla y León, Cataluña, Comunidad Valenciana, Extremadura, Islas Baleares, Comunidad de Madrid, Región de Murcia, Navarra y La Rioja. (Figura 19). Entre 1996 y 2011, la incidencia media anual notificada estuvo alrededor de 0,45 casos/100.000 habitantes, sin embargo, en este periodo algunas comunidades (Islas Baleares, Andalucía, Comunidad de Madrid, Comunidad Valenciana y Cataluña) mostraron tasas de incidencia superiores a la media (Amela *et al.*, 2012). En este periodo, aproximadamente 1.201 casos fueron notificados a la RENAVE. Sin embargo, los datos obtenidos al analizar el CMBD durante el periodo 1997-2011 muestran un número más elevado de casos, 3.442 casos con un diagnóstico principal de leishmaniasis, lo que se traduce en una tasa media anual nacional de 2,8 casos/100.000 habitantes (Amela *et al.*, 2012; Herrador *et al.*, 2015). En general, la distribución de la leishmaniasis por edad presenta dos máximos: uno en menores de 5 años y el otro en adultos de 30 a 49 años. Los casos en las primeras edades corresponden al patrón tradicional de la enfermedad, mientras que el segundo grupo refleja los casos de coinfección *Leishmania*/VIH (Amela *et al.*, 2012).

En la Figura 20, se observa la tendencia de las hospitalizaciones por leishmaniasis entre 1997 y 2011. Desde 2009, llama la atención el ascenso en el número de casos de pacientes que no

presentan coinfección con VIH, con un aumento bastante marcado en 2010 debido a los casos asociados al brote de la Comunidad Autónoma de Madrid, que se tratará en el siguiente apartado.

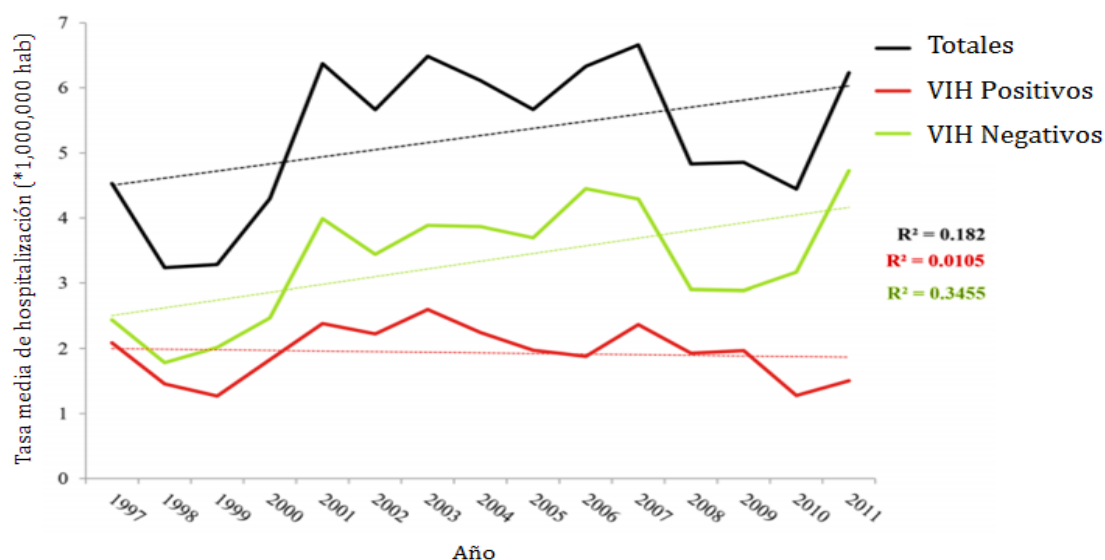


Figura 20. Tendencia de los casos de leishmaniasis según los datos registrados en el CMBD (diagnóstico principal leishmaniasis). Comparación entre el número total de casos y el número de casos sin coinfección con VIH. España 1997-2011. Adaptado de Herrador *et al.*, (2015).

3.1. Brote de leishmaniasis humana en la Comunidad Autónoma de Madrid

En la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) la leishmaniasis humana ha sido tradicionalmente catalogada como una enfermedad hipoendémica, con un registro de 12 a 25 casos anuales principalmente en niños y adultos inmunodeprimidos (BECM, 2015). Sin embargo, a finales del año 2010 se observó un aumento inusual del número de casos en la zona suroeste de la CAM. La investigación de los casos mostró que desde julio de 2009 se estuvo produciendo de manera sostenida un brote de leishmaniasis en dicha localidad.

En la Figura 21 se presenta la distribución anual de los casos detectados en la CAM entre 2001 y 2015 (hasta mayo 2015), según su forma de presentación como casos asociados o no al brote. Desde julio de 2009 hasta mayo de 2015 se notificaron 644 casos (6 casos en 2009, 97 casos en 2010, 197 casos en 2011, 160 casos en 2012, 87 casos en 2013, 86 casos en 2014 y 11 casos en

2015), lo que ha significado un incremento en la tasa de incidencia (TI) de la enfermedad en esta área desde 2,44 casos/ 100.000 habitantes en 2009 a 18,91 casos/ 100.000 habitantes en 2015, según los datos suministrados por la Consejería de Sanidad de la CAM (BECM, 2015; Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012). Los casos asociados al brote representan alrededor del 80% de todos los casos notificados a la CAM desde 2009.

Aproximadamente el 38% de los casos (244 casos) corresponden a LV, mientras que la mayoría, aproximadamente el 62% restante (400 casos) han sido casos de LC. Algunos pacientes presentaron manifestaciones atípicas para *L. infantum*, como leishmaniasis ganglionar o mucocutánea (Aguado *et al.*, 2013; Arce *et al.*, 2013). El 59,6% de los casos eran de sexo masculino, se vieron afectados todos los rangos de edad, entre 2 meses y 95 años, con una media de edad de 44 años, la mayoría de los casos se concentró en los mayores de 30 años. De manera interesante, tan sólo el 16,3% de los afectados presentaba alguna condición inmunosupresora que pudiese considerarse un factor de riesgo para el desarrollo de leishmaniasis (Aguado *et al.*, 2013; Arce *et al.*, 2013).

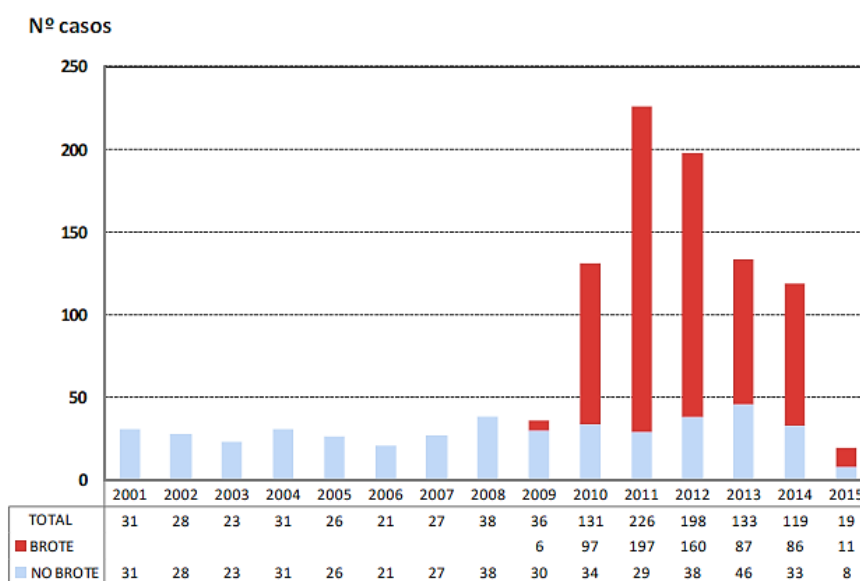


Figura 21. Evolución temporal del número de casos de leishmaniasis en la CAM, 2001-2015 (actualizado a 25 de mayo de 2015), según fecha de inicio de los síntomas. Fuente: Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid.

Los casos implicados en el brote residen en Fuenlabrada (510 casos; TI: 43,47), Leganés (68 casos; TI: 6,14), Getafe (56 casos; TI: 5,53) y Humanes de Madrid (10 casos; TI: 8,93), municipios geográficamente cercanos a las inmediaciones de los parques forestales de Bosque Sur y Polvoranca. En la Figura 22 se puede apreciar que la mayor parte de los casos residen en la

zona norte de Fuenlabrada con una mayor concentración espacial en el norte del casco urbano, en la zona limítrofe con el suelo no edificado.

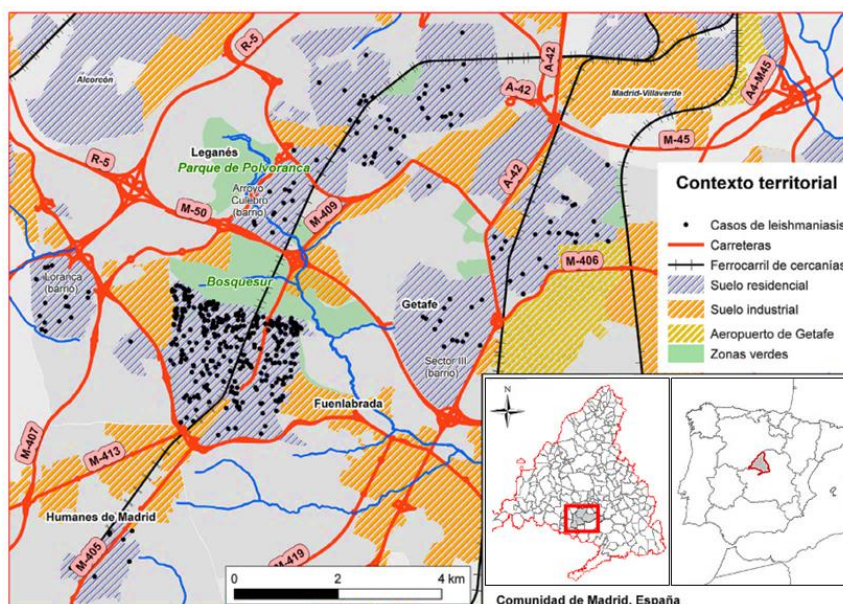


Figura 22. Localización y distribución de casos del brote de leishmaniasis humana de la zona suroeste de la CAM según residencia. Imagen adaptada de Aránguez-Ruiz *et al.*, (2014).

Durante el periodo del brote no se detectó un aumento en el número de perros infectados en los municipios afectados, situándose en una tasa inferior a la esperada, por debajo del 2%, tal y como indican los estudios serológicos en más de 1.500 perros realizados entre 2011-2012 (Gálvez *et al.*, 2010; Vilas *et al.*, 2012). Este hecho hizo plantearse que los perros no estaban participando como reservorio principal en este brote. En 2011 se comenzó la investigación de otros animales como gatos, ratas, conejos y liebres, que pudieran estar implicados en la transmisión de *Leishmania*. Y en estudios llevados a cabo entre 2011 y 2016 se observó la presencia de ADN de *L. infantum* en distintos tejidos de liebres (29,9%; 100/334), conejos (21,2%; 134/631) y gatos (7,3%) (Vilas, 2017). Los estudios serológicos revelaron la presencia de anticuerpos en hasta el 74,1% de las liebres, 45,7% de los conejos y 9,3% de los gatos de la zona (Moreno *et al.*, 2014).

Se comprobó a su vez que existía una gran concentración de liebres (265 liebres/ km²) en los parques de Bosque Sur y Polvoranca, limítrofes con la zona del brote, contribuyendo a un ecosistema idóneo para mantener una presencia abundante de flebótomos (Aguado *et al.*, 2013; Antoniou *et al.*, 2013; García *et al.*, 2014; Vilas *et al.*, 2012), y favoreciendo las infecciones por *L. infantum* en poblaciones de liebre y conejo, que resultaron una fuente de alimentación sanguínea preferida para las poblaciones de *P. perniciosus* de la zona (Jiménez *et al.*, 2013, 2014; Molina *et al.*, 2012; Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012). Además, los estudios de xenodiagnóstico

llevados a cabo por la Unidad de Entomología Médica del Instituto de Salud Carlos III demostraron que tanto liebres como conejos capturados en la zona del brote, eran capaces de transmitir *L. infantum* a *P. perniciosus*, hecho desconocido hasta la fecha (Jiménez *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2012). Esto, junto con investigaciones entomológicas realizadas entre 2012 y 2013, permitió demostrar que *P. perniciosus* era el vector implicado en este brote, con una densidad de población de 152,6 flebótomos/m² muy superior a la habitual, y con tasas de infección por *Leishmania* determinadas por PCR de hasta el 58% (Jiménez *et al.*, 2013, 2014).

Es importante destacar que, debido al aumento de los viajes y el comercio internacional, así como a la emergencia y re-emergencia de enfermedades de importancia en salud pública internacional, a la situación epidemiológica actual de España respecto a la leishmaniasis y a las normas que requieren los organismos internacionales a los Estados miembros de la OMS, se modificaron los anexos I, II y III del R.D. 2210/1995. Y desde el 17 de marzo de 2015 la leishmaniosis pasa a ser considerada por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad una E.D.O a nivel nacional (B.O.E. nº65, 2015).

4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIASIS

Todas las especies del género *Leishmania* son similares morfológicamente, por lo que no es posible su identificación a nivel de especie mediante técnicas de microscopia y por tanto, son necesarias técnicas bioquímicas y moleculares (Ashford, 2000). La caracterización (tipado, tipificación) genética de patógenos permite su identificación a nivel de cepa (seguimiento epidemiológico), subespecie y especie (taxonomía), así como explorar el impacto de la diversidad genética en aspectos relevantes a nivel biomédico, como la virulencia o la resistencia a drogas (Tibayrenc, 1998). En general, las técnicas de tipado se dividen en fenotípicas (basadas en características bioquímicas o fisiológicas de los microorganismos) y genotípicas o moleculares (basadas en el estudio del ADN/ARN).

Las técnicas de tipado molecular se diferencian de las técnicas fenotípicas porque pueden aplicarse a un mayor número de especies, tienen mayor poder de tipado, son más reproducibles y tienen mayor poder de discriminación. Quizás el principal interés de estas técnicas radica en su capacidad para establecer la relación que existe entre aislados implicados en un brote, además de ser herramientas muy útiles para confirmar la fuente de infección o reservorio (Fernández-Cuenca *et al.*, 2013). Las técnicas de tipado fenotípicas se usan cada vez con menos frecuencia debido a problemas relacionados con su baja reproducibilidad y limitado poder discriminatorio. No

obstante, una de estas técnicas, la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE, por sus siglas en inglés) continúa siendo para muchos el método de referencia, si bien es actualmente un asunto en discusión (Van der Auwera *et al.*, 2011).

4.1. Caracterización fenotípica de *Leishmania*: electroforesis de enzimas multilocus

Esta técnica se basa en las diferencias en la movilidad electroforética de un grupo determinado de enzimas al someterse a un campo eléctrico. Los organismos que comparten el mismo perfil o patrón combinado de movilidad de dichas enzimas constituyen un zimodema (Rioux *et al.*, 1990). En el campo de la leishmaniasis se ha venido utilizando este concepto para clasificar los aislados de *Leishmania* a nivel de especie y subespecie, de manera que las cepas pertenecen al mismo zimodema cuando comparten un mismo perfil isoenzimático (Pratlong *et al.*, 2009, 2013).

El protocolo de MLEE está unificado en el sur de Europa, utilizando los mismos 15 sistemas enzimáticos y el almidón como sustrato para la electroforesis. Se emplea la denominación MON-seguido de un número (de Laboratoire d'Ecologie Médicale de Montpellier, Francia), para referirse al zimodema al cual pertenece un aislado (Rioux *et al.*, 1990). La técnica de MLEE se ha empleado tanto para clasificar las especies de *Leishmania* en el Viejo y Nuevo Mundo, como para establecer relaciones filogenéticas entre especies (Cupolillo *et al.*, 1994; Rioux *et al.*, 1990), e identificar zimodemas asociados a regiones geográficas y manifestaciones clínicas específicas.

El empleo de MLEE en estudios epidemiológicos puso de manifiesto la existencia de un elevado polimorfismo en las cepas de *L. infantum*, con más de 40 zimodemas descritos en diferentes hospedadores (humanos, perros, caballos, ratas) y vectores (Chicharro *et al.*, 2003; Gallego *et al.*, 2001; Martín-Sánchez *et al.*, 2004; Morillas-Márquez *et al.*, 1985; Solano-Gallego *et al.*, 2003). Veinticinco de los zimodemas descritos para *L. infantum* se han encontrado en España, algunos mayoritariamente en casos de LV, considerándose como viscerotropos (MON-27, MON-28, MON-72, MON-77 y MON-187), mientras que otros se consideran dermatropos al ser aislados única o principalmente de lesiones cutáneas (MON-11, MON-24, MON-29, MON-33, MON-78, MON-111) (Pratlong *et al.*, 2004). Sin embargo, éstos últimos también pueden encontrarse causando LV en individuos inmunodeprimidos. Otros zimodemas, se han relacionado tanto con LV como LC (MON-1, MON-34, MON-80 y MON-190). Resulta interesante que, en el perro, principal reservorio de *L. infantum* en España, hasta la fecha solo se han aislado seis de los 22 zimodemas descritos en humanos.

No obstante, esta técnica presenta importantes limitaciones, como su bajo poder discriminatorio intraespecífico, ya que la mayoría de los aislados de *L. infantum* se clasifican como zimodema MON-1 (Pratlong *et al.*, 2003), zimodema que, en estudios posteriores, basados en técnicas moleculares, se ha podido separar en diferentes poblaciones (Kuhls *et al.*, 2008; Mauricio *et al.*, 2006). Según ha ido avanzando el uso de la biología molecular en el estudio de la Leishmaniasis, se han puesto de manifiesto las limitaciones del sistema MLEE, principalmente (Schönian *et al.*, 2011):

- En ocasiones la variabilidad a nivel de secuencia en determinados genes da lugar a un mismo perfil isoenzimático (Mauricio *et al.*, 2006).
- las diferentes movilidades electroforéticas no siempre están asociadas a cambios en la composición nucleotídica (por ejemplo, pueden deberse a modificaciones postraduccionales) (Ochsenreither *et al.*, 2006).
- Se han demostrado que diferentes perfiles isoenzimáticos pueden deberse a perfiles heterocigotos o simplemente al cambio de un único nucleótido (*SNP*) (Jamjoom *et al.*, 2004; Mauricio *et al.*, 2006).
- El método es muy laborioso, costoso, requiere de gran cantidad del parásito y los datos de los laboratorios donde se realizan estos análisis son difíciles de comparar.
- Estudios recientes de biología molecular muestran una falta de correlación con la clasificación de las especies de *Leishmania* mediante MLEE, y además se ha demostrado la presencia de diferentes genotipos en un mismo zimodema (Fraga *et al.*, 2010).

Estas limitaciones han promovido el empleo de las técnicas de biología molecular en la taxonomía y epidemiología de la leishmaniasis.

4.2. Caracterización genética de *Leishmania* spp.

4.2.1. El genoma de *Leishmania* spp.

El genoma de *Leishmania* está compuesto por el ADN nuclear y el ADN mitocondrial (también llamado ADN del kinetoplasto, kDNA) (Simpson *et al.*, 2006). El kDNA representa del 10 al 20% del ADN del parásito y está constituido dos tipos de moléculas de ADN circular y organizadas en una complicada estructura de red: los maxicírculos y minicírculos (Figura 23).

Los maxicírculos son el homólogo funcional del ADN mitocondrial de otros eucariotas, con un tamaño que varía entre 20 y 40 kb en las distintas especies y su secuencia está bastante conservada entre las decenas de copias que componen esta parte del kDNA (Simpson *et al.*, 1987). En ellos se encuentran los genes que codifican los ARN ribosómicos mitocondriales y aquellos encargados

de los procesos energéticos del parásito, como el gen de la citocromo-oxidasa y NADH-deshidrogenasa, entre otros (Bañuls *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2006). Los minicírculos se encuentran en miles de copias, representando hasta el 99% del kDNA, tienen un tamaño de aproximadamente 1kb y están compuestos por una región constante y una variable (Simpson *et al.*, 1987). Los minicírculos representan una diana apropiada para el diagnóstico molecular de la leishmaniasis debido a su elevado número de copias, el análisis de la región variable permite, además, diferenciar entre especies de *Leishmania* (Aransay *et al.*, 2000).

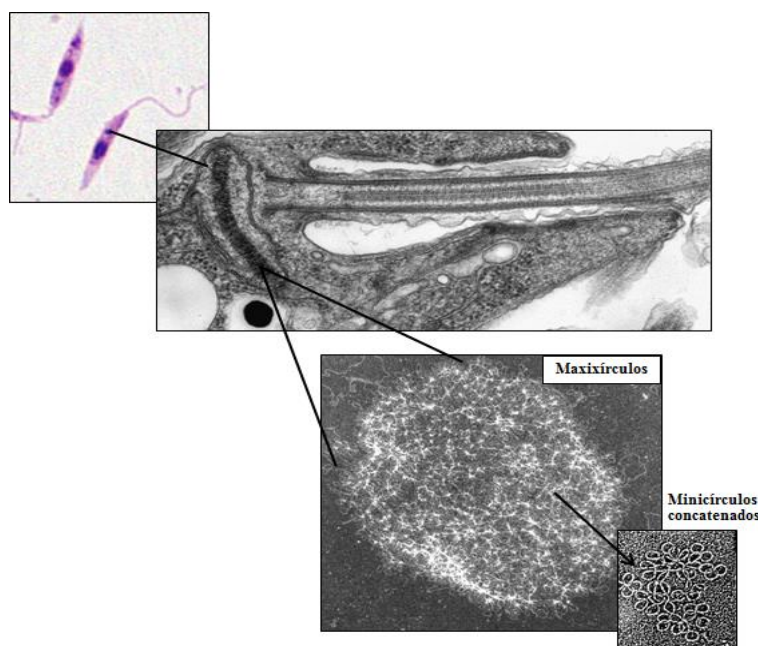


Figura 23. Microfotografía electrónica del kDNA. La imagen muestra una sección longitudinal a través del extremo anterior del kinetoplasto, en el que el flagelo emerge de la bolsa flagelar. El kinetoplasto contiene el kDNA organizado en una red de moléculas de ADN circular, que forma una cola nucleoide en forma de disco compacto, visible en esta sección como una densa estructura con forma de barra. Imágenes adaptadas de Cell Image Library (<http://www.cellimagelibrary.org/images>).

En la actualidad, se acepta que *Leishmania* es un organismo aneuploide y funcionalmente asexual, con un genoma de aproximadamente 35 Mb, organizado en 34-36 cromosomas, cuyo tamaño oscila entre 0,3 y 2,5 Mb (Ivens *et al.*, 1998; Lachaud *et al.*, 2014; Wincker *et al.*, 1996). A pesar de que el número de cromosomas es variable, el orden y organización genética sigue siendo el mismo entre las especies (Tamar *et al.*, 2000). En *Leishmania* la aneuploidía se ha identificado como un mecanismo del parásito para responder a los cambios en su entorno, por ejemplo, el número de copias cromosómicas podría cambiar de manera dinámica reflejando procesos de adaptación, como la resistencia a fármacos (Laffitte *et al.*, 2016; Tibayrenc & Ayala, 2017). El genoma de *Leishmania* es rico en G-C (59,7%), especialmente en las regiones que codifican para proteínas (ORF, del inglés *Open Reading frame*) (Peacock *et al.*, 2007). Así mismo, entre las

regiones no traducidas (UTR, del inglés *Un-Translated Regions*) el contenido en G-C es mayor en las 3'UTR que las 5'UTR (Bañuls *et al.*, 2007; Ivens *et al.*, 2005).

En *Leishmania* los genes que codifican proteínas carecen de intrones y se disponen en largas agrupaciones ordenados en tándem. No obstante, algunos genes presentan una única copia (Ivens *et al.*, 1998). Con frecuencia, los genes que presentan varias copias poseen una elevada conservación de las secuencias codificantes y una mayor divergencia en las secuencias de regiones no traducidas 5'-UTR y 3'-UTR, como ocurre con el gen de la histona H2A (Soto *et al.*, 2003). En otros casos, como los genes de las proteínas GP63 y HASPB, se reportan numerosas regiones variables producto de recombinaciones intragénicas que podrían reflejar procesos de adaptación (Kathleen Victoir & Dujardin, 2002).

4.2.2. Reproducción en *Leishmania*

El mecanismo de reproducción de *Leishmania* ha sido y continúa siendo objeto de debate. Actualmente se admiten dos hipótesis, que podrían ser compatibles: clonalidad y sexualidad. Durante los últimos años se ha considerado la existencia de reproducción clonal junto con episodios de recombinación genética poco frecuente, reforzada por la observación de híbridos interespecíficos (Bastien *et al.*, 1992; Ravel *et al.*, 2006; Rougeron *et al.*, 2010; Tibayrenc & Ayala, 2002). Algunos autores proponen que las especies de *Leishmania* podría alternar los dos modos de reproducción dependiendo de la fase del ciclo biológico en la que se encuentren: clonalidad tanto en el hospedador vertebrado como en el insecto vector y recombinación (endogamia) en el vector (Rougeron *et al.*, 2010; Sterkers *et al.*, 2014).

4.2.3. Tipado molecular de *Leishmania*

Los marcadores moleculares son atributos del ADN que pueden ser identificados dentro del genoma de manera específica y que pueden constituir herramientas de utilidad en la identificación de especies, cepas, híbridos, análisis de diversidad, con aplicación en distintos contextos, como genética de poblaciones, biología evolutiva, epidemiología molecular, etc. (Avise, 1994). Las técnicas basadas en el análisis del ADN del parásito constituyen actualmente el principal método de diagnóstico y caracterización molecular debido a su alta sensibilidad y a que, en la mayoría de los casos, permiten su aplicación directa en muestras clínicas, es decir sin la necesidad de aislar el parásito (de Ruiter *et al.*, 2014; Weigle *et al.*, 2002). Estos métodos por lo general utilizan una

reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya sea genérica que amplifica cualquier especie de *Leishmania* o una PCR específica que amplifica una sola o múltiples especies, complejos de especies, o subgéneros (Figura 24). La principal aproximación consiste en resolver los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa (en ocasiones tras digerirlos con una enzima de restricción, PCR-RFLP) y posterior visualización tras usar un agente intercalante de ADN o por detección de la fluorescencia en los formatos de PCR a tiempo real. Esta aproximación puede ir seguida de una secuenciación del producto de PCR si fuera necesario obtener más información (Figura 24).

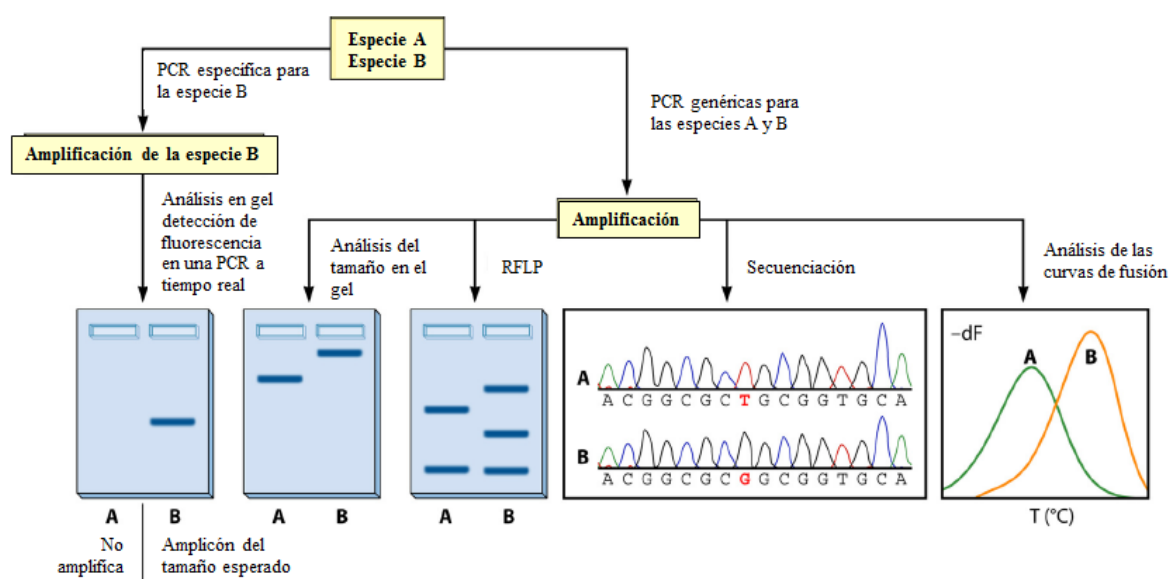


Figura 24. Esquema general de las técnicas comúnmente empleadas en el tipado molecular de *Leishmania*. Ejemplo de su uso en la discriminación entre dos especies A y B (Adaptado de Van der Auwera & Dujardin, 2015).

Son varias las regiones del genoma de *Leishmania* (marcadores moleculares), con diferentes niveles de resolución que se han estudiado, tanto en el ADN nuclear como en el ADN mitocondrial. Contribuyendo la variabilidad nucleotídica en estas regiones y genes al diseño de herramientas moleculares para mejorar el diagnóstico y contribuir a la epidemiología de la leishmaniasis, algunos de los más utilizados en los últimos años se describen a continuación:

- i. **ADN ribosomal (rDNA).** El rDNA es uno de los marcadores moleculares más empleados en el diagnóstico y tipado de *Leishmania*. El rDNA se encuentra repetido en tándem, unas 10-20 copias por genoma haploide, lo que permite su detección sensible en muestras clínicas. Cada unidad de repetición se compone de varios genes y de los espaciadores intergénicos.

Las regiones espaciadoras del operon ribosomal contienen suficiente variabilidad nucleotídica como para discriminar los aislados a nivel de subespecie (El Tai *et al.*, 2000; Kuhls *et al.*, 2005; Schönian *et al.*, 2001). El estudio de la secuencia del espaciador transcrito interno-1 (ITS1) permite identificar las especies de *Leishmania* del hemisferio oriental (Schönian *et al.*, 2003).

- ii. **Minicírculos de kDNA.** Los minicírculos son el componente del kDNA que más se ha utilizado como diana en diferentes métodos de diagnóstico y tipado molecular. Estos son pequeñas moléculas circulares con un tamaño de alrededor de 800 pb que están compuestos de una región conservada de 120 pb y una región hipervariable de entre 600 y 700 pb. La variabilidad nucleotídica observada en la región hipervariable entre las distintas familias de minicírculos dificulta la secuenciación directa de los mismos, por lo que su uso en el tipado de *Leishmania* ha quedado restringido al estudio del polimorfismo de fragmentos de restricción, RFLP (Morales-Hernández, 2002).
- iii. **Glicoproteína metaloproteasa 63 (GP63).** Esta es la principal glicoproteína de superficie de *Leishmania*, y se considera que es un importante inmunógeno y factor de virulencia (Rivier *et al.*, 1999). El gen se estructura en una serie de repeticiones en tándem, y tanto las regiones intra- como intergénicas han sido utilizadas en el tipado de *Leishmania*, principalmente mediante RFLP. Esta aproximación se ha utilizado tanto para identificar especies como para estudiar la variabilidad intraespecífica; no obstante, su poder discriminatorio en este último caso es limitado (Guerbouj *et al.*, 2001; Mauricio *et al.*, 2001; Quispe-Tintaya *et al.*, 2004; Van der Auwera & Dujardin, 2015; Kathleen Victoir *et al.*, 1998). Algunos autores sugieren que, al ser una proteína antigénica, y por tanto sometida a presión por el sistema inmunitario, podría quizás ser adecuada para identificar polimorfismos asociados a distintas manifestaciones clínicas de la leishmaniasis (Gupta & Anderson, 1999).
- iv. **Cisteín proteinasa B (CPB).** Esta es otra proteína antigénica, que también presenta varias copias organizadas en tándem (Quispe-Tintaya *et al.*, 2004). Sin embargo, no todas las copias son idénticas, clasificándose en distintos grupos (Hide & Bañuls, 2008; Laurent *et al.*, 2009). CPB se considera un factor importante en la interacción hospedador-parásito y, al igual que GP63, quizás más apta para el estudio de las poblaciones del parásito dentro del contexto clínico (Pollock *et al.*, 2003).
- v. **Proteína de superficie acilada hidrofílica B (HASPB o K26).** Esta es una proteína que parece tener un marcado carácter antigénico, siendo capaz de sobreestimar la producción

de linfocitos B, desviando así la respuesta inmune celular (Haralambous *et al.*, 2008) en favor del parásito, y también parece ser determinante en la generación de promastigotes metacíclicos (la forma infectiva de *Leishmania* transmitida por el vector). Dicha proteína fue identificada originalmente en el cromosoma 23, en el locus LmcDNA16 y pertenece a una familia de genes ortólogos que se encuentran en especies de *Leishmania* presentes en el Viejo y Nuevo Mundo (Depledge *et al.*, 2010). El gen *k26* presenta una región central compuesta de repeticiones de 14 aminoácidos, siendo extremadamente polimórfico, tanto en tamaño como en secuencia nucleotídica, una característica que hace de este gen una diana interesante para el tipado de *Leishmania* (Cunha *et al.*, 2013; Depledge *et al.*, 2010; Haralambous *et al.*, 2008).

- vi. **Proteína de choque térmico 70 (HSP70).** Esta proteína juega un papel fundamental para garantizar la adaptación a los cambios de temperatura entre el vector y el hospedador vertebrado, jugando el papel de chaperona asistiendo en el plegado y transporte de proteínas. En el genoma de *Leishmania* se encuentran entre 5 y 10 copias de este gen, organizadas en tándem y pudiéndose localizar en diferentes loci dentro de un mismo cromosoma (Folgueira *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2013). A pesar que su secuencia está muy conservada entre especies, existen pequeñas variaciones nucleotídicas que han permitido utilizar esta diana para diferenciar especies de *Leishmania* de manera consistente, considerándose de gran ayuda en la taxonomía de *Leishmania* (Fraga *et al.*, 2010; García *et al.*, 2014; Montalvo *et al.*, 2012, 2010; Van der Auwera *et al.*, 2013).
- vii. **Tipado de secuencias multilocus (MLST).** El tipado mediante MLST o MLSA (*Multilocus Sequence Typing /Analysis*) se basa en el análisis de las secuencias de ADN de distintas dianas del genoma, siendo capaz de determinar polimorfismos de un único nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*). En el sistema MLSA se suelen elegir entre 4 y 7 genes que no estén sometidos en exceso a presión evolutiva, de manera que se encuentren relativamente conservados entre aislados de una misma especie, generalmente se seleccionan genes *housekeeping* (Maiden *et al.*, 1998). En alguno de los estudios de MLSA de *Leishmania* se han utilizado los mismos genes, o similares, que en el sistema de MLEE (Mauricio *et al.*, 2006; Zemanová *et al.*, 2007). Este sistema combina la secuenciación y las técnicas de genética de poblaciones para proporcionar un sistema portátil, reproducible y escalable de datos que refleja la variación intraespecífica en diferentes organismos. A cada tipo de secuencia única en cada una de las dianas (loci) se le asigna un haplotipo y la combinación de los haplotipos encontrados en los loci conforma un tipo de secuencia o genotipo. La principal ventaja que presenta esta metodología es su gran reproducibilidad, haciendo que los

resultados de secuenciación de ADN sean fácilmente comparables entre laboratorios y, por tanto, adecuados para ser compartidos en bases de datos públicas, lo que la convierte en buen candidato a convertirse en la técnica de referencia para el estudio taxonómico y de tipado de *Leishmania*, en sustitución del MLEE, en el futuro (Schönian *et al.*, 2011, 2008). Hasta la fecha, esta técnica ha sido empleada en el estudio de poblaciones de *L. donovani* usando hasta 10 dianas distintas (Baleela *et al.*, 2014; Mauricio *et al.*, 2006; Zemanová *et al.*, 2007) y de *Leishmania (Viannia)* con 7 dianas llegando a discriminar tanto a nivel de especie como de cepa, contribuyendo a la vigilancia epidemiológica, detección de nuevos genotipos y seguimiento de brotes (Boite *et al.*, 2012; El Baidouri *et al.*, 2013; Marco *et al.*, 2015; Marlow *et al.*, 2014; Tsukayama *et al.*, 2009).

viii. Tipado de secuencias microsatélites multilocus (MLMT). Los sistemas de MLMT (*Multilocus Microsatellite Typing*) se basan en la combinación del análisis del polimorfismo de la longitud de las secuencias que contienen microsatélites, seleccionando entre 14 y 20 locus. Las secuencias microsatélites, son pequeñas secuencias de entre 1 y 6 pares de bases, repetidas en tándem, que se encuentran en los genomas de procariotas y eucariotas, tanto en regiones codificantes como no codificantes. Los microsatélites se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud, lo que facilita los cambios de longitud de sus alelos siendo detectables diferencias de hasta una sola base. A partir del tamaño de los fragmentos analizados se realiza un perfil para cada muestra mediante el cálculo de las distancias génicas. Estas secuencias presentan una tasa de mutación mucho mayor que el grueso del ADN, atribuida a eventos de inserción y delección durante la replicación del ADN, lo que las hace extremadamente útiles en el estudio de la variabilidad genética entre organismos de una misma especie misma especie (Schlötterer, 2000; Zane *et al.*, 2002). En este tipo de análisis se utilizan cebadores conjugados con fluorógenos para la amplificación de las regiones microsatélites y posterior estudio del polimorfismo de su tamaño mediante electroforesis capilar, generalmente usando un secuenciador automático. Este método ha sido utilizado para la caracterización de *L. donovani* y *L. infantum*. Aplicando el tipado mediante MLMT, varios autores describieron la estructura del complejo *L. donovani* en distintas áreas endémicas, y encontraron a su vez una muy elevada diversidad alélica entre los aislados de *L. infantum* de la cuenca mediterránea sugiriendo que el MLMT proporciona una poderosa herramienta para la taxonomía global, genética de poblaciones y estudios epidemiológicos relacionados con el complejo *L. donovani*. No obstante, a pesar de unos inicios prometedores, esta herramienta ha mostrado una serie de desventajas que han dificultado una amplia aceptación, principalmente que es necesario seleccionar un conjunto de marcadores específico para cada especie (al contrario que en MLSA), y que el método no es fácilmente

reproducibile entre laboratorios, ya que requiere de experiencia en el análisis de los electromorfos, pudiendo llegar a ser muy subjetivo (Schönian *et al.*, 2011, 2008).

4.3. Epidemiología molecular de la leishmaniasis

En el campo de las enfermedades infecciosas, se podría considerar que la epidemiología molecular abarca, entre otros aspectos, la identificación de los agentes responsables de una enfermedad infecciosa, su origen, sus relaciones biológicas, y su ruta de transmisión; así como la identificación y caracterización de los genes implicados en la virulencia del patógeno, aquellos relevantes para el diseño de vacunas o pruebas diagnósticas, y los que pueden estar implicados en la resistencia al tratamiento (Struelens & Brisse, 2013). En el caso la leishmaniasis, así como en el de otras enfermedades infecciosas transmitidas por vector, la definición se puede ampliar al estudio de atributos de este último como son la identificación de especies portadoras del parásito, las distintas subpoblaciones del vector y su distribución en los focos de transmisión, así como sus preferencias alimentarias. En general, se trata de establecer vínculos entre la variabilidad genética del patógeno y su distribución en la población de hospedadores con el objetivo de prevenir la enfermedad en poblaciones humanas (Foxman & Riley, 2001).

Muy frecuentemente el término de epidemiología molecular es usado para describir estudios que están más relacionados con los campos de la taxonomía o la filogenia molecular. También es importante destacar que la aplicación per se de técnicas de biología molecular para el tipado o caracterización molecular de un organismo (entendámoslo como descripción) a nivel genético de un(os) determinado(s) locus (loci), no constituye un estudio de epidemiología molecular a no ser que estas herramientas se apliquen en el contexto de una pregunta epidemiológica formulada correctamente.

La selección del método molecular apropiado depende en gran medida de la naturaleza del problema a resolver, así como el tiempo y el contexto geográfico en el que se va a utilizar el método. Cada uno de estos marcadores moleculares tiene su poder discriminatorio específico, ventajas y desventajas. La elección del marcador es especialmente importante para la elección del nivel de resolución al que queramos llegar. Si el marcador detecta demasiada variación es posible que no represente fielmente las relaciones entre los organismos y por lo tanto, no identifique los rasgos útiles. Si por el contrario, es sólo moderadamente variable no explorará las diferencias entre las muestras estrechamente relacionadas. Estas aproximaciones también dependen del empleo de marcadores neutrales que no se vean afectados por los mecanismos de selección natural. Sin embargo, en ocasiones el uso de marcadores no-neutrales resultará también útil para

identificar algunas características de las cepas de *Leishmania* a estudio, como factores de virulencia o atributos relacionados con una mayor capacidad de transmisión.

En la investigación de brotes el método debe tener la capacidad de discriminación necesaria para distinguir los casos que están epidemiológicamente relacionados y, a ser posible, identificar factores que revelen la historia de la transmisión. En el contexto de la vigilancia epidemiológica, estos métodos deben producir resultados consistentes a lo largo del tiempo (Sabat *et al.*, 2013). El uso del marcador adecuado, empleado correctamente, puede contribuir a resolver numerosas preguntas relacionadas con la epidemiología de la leishmaniasis.

4.3.1. Aplicaciones de la biología molecular en la epidemiología de la Leishmaniasis

Las herramientas de biología molecular pueden utilizarse para ampliar el conocimiento de los diferentes componentes del ciclo de transmisión en la epidemiología de la leishmaniasis. No obstante, para que adquieran sentido, deben emplearse en el contexto de un estudio epidemiológico claramente definido. En la Tabla 6 se describen las principales aplicaciones y objetivos que persigue el uso de los marcadores moleculares en la epidemiología de la leishmaniasis.

Tabla 6. Contribución de las herramientas de biología molecular al conocimiento de cada uno de los actores relacionados con el ciclo de transmisión de *Leishmania*.

Agente	Aplicación	Objetivo
Parásito	Identificación de especie	▪ Instauración de tratamiento adecuado
	Tipado al nivel de intraespecie	▪ Asociación genotipo-fenotipo ▪ Caracterización de brotes
	Estructura de poblaciones al nivel de intraespecie	▪ Determinación de la propagación del parásito ▪ Vigilancia epidemiológica
Vector	Identificación de especie	▪ Vigilancia epidemiológica
	Estructura de poblaciones al nivel de intraespecie	▪ Determinación de la propagación de vectores
	Detección de <i>Leishmania</i>	▪ Identificación de posibles vectores
	Determinación del origen de la ingesta de sangre	▪ Identificación de posibles reservorios
Hospedador	Detección de <i>Leishmania</i> en muestras biológicas	▪ Diagnóstico ▪ Identificación de posibles reservorios
	Estudio del genoma del hospedador	▪ Identificación de determinantes genéticos de susceptibilidad/resistencia a la infección

4.3.1.1. Investigación molecular en el vector

Los flebótomos son la pieza clave en la transmisión de *Leishmania*, y por tanto en el control de la leishmaniasis. La biología molecular permite determinar la fuente de ingesta de sangre en hembras de flebótomo, así como si estas son portadoras de *Leishmania*; por otra parte, el estudio de determinadas regiones del genoma de estos dípteros posibilita la identificación de especies y la caracterización y determinación de distintas poblaciones del vector al nivel de infra-especie.

4.3.1.1.1. Identificación del origen de la fuente de sangre en hembras de flebótomo

La identificación de la sangre ingerida por los flebótomos permite averiguar sobre qué animales se alimentan preferentemente los flebótomos y, consecuentemente, identificar posibles reservorios de *Leishmania*. La mayoría de las aproximaciones descritas consisten en la amplificación y secuenciación de determinados fragmentos de los genes *citocromo b* (*cytb*) o *citocromo oxidasa I* (*COI*) de vertebrados, ambos genes mitocondriales con una alta significancia filogenética, cuyo estudio posibilita la identificación correcta del animal del cual ha obtenido la sangre el artrópodo (Alcaide *et al.*, 2009; Mohammad Ali Oshaghi *et al.*, 2006).

Diferentes estudios han constatado que algunas especies de flebótomos se comportan de manera oportunistas, sin preferencia entre las distintas especies de vertebrados disponibles para la ingesta de sangre (Maia *et al.*, 2015; Sales *et al.*, 2015). Es importante tener en cuenta también que la mayor frecuencia de alimentación sobre una especie dada puede estar relacionada con el hecho de que esta sea más abundante en el entorno, y no con una preferencia real por la misma. No obstante, el carácter oportunista de los flebótomos permite obtener una visión general de los potenciales reservorios de *Leishmania* en un contexto dado y que serían por tanto aquellos en los que realizar los estudios dirigidos a la identificación de reservorios.

4.3.1.1.2. Detección de *Leishmania* en el vector

Las técnicas de detección de ADN de *Leishmania* basadas en la PCR, se aplican habitualmente en muestras clínicas de origen humano y de posibles reservorios tanto para detectar la infección como para apoyar el diagnóstico. Esta aproximación es igualmente útil para detectar la presencia de *Leishmania* en flebótomos. La detección de ADN de *Leishmania* en los flebótomos que presenten sangre de ingesta no necesariamente confirma su capacidad vectorial, ya que la presencia de ADN del parásito no implica la viabilidad del mismo ni que este pueda ser

transmitido cuando el flebótomo vuelva a ingerir sangre de un nuevo hospedador. Por el contrario, esto es más preciso en flebótomos que no presentan sangre ingerida, ya que en este caso el ADN de *Leishmania* detectado correspondería con parásitos que han superado el proceso de digestión y defecación del flebótomo, indicando que podrían llegar a ser transmitidos (Sadlova *et al.*, 2013). Es importante resaltar que la confirmación definitiva de que los parásitos presentes en un flebótomo pueden llegar a ser transmitidos, viene dada por la disección del vector y observación microscópica de los parásitos en la porción anterior de su aparato digestivo. No obstante, este procedimiento es laborioso, requiere tiempo y un alto grado de especialización. Por ello, los métodos moleculares, al presentar mayor capacidad de procesamiento cuando se trabaja con un elevado número de muestras, resultan de gran ayuda siempre y cuando se ejecuten correctamente (Alcover *et al.*, 2012).

4.3.1.1.3. Identificación de especie de vector

Un componente esencial en la vigilancia de enfermedades transmitidas por artrópodos es la identificación correcta de las posibles especies de vector; siendo esta de gran ayuda para comprender la biodiversidad, biología y comportamiento de los flebótomos con capacidad vectorial. La identificación de especie se basa en la determinación de características morfológicas concretas del insecto (Lewis, 1978). No obstante, el uso de las claves taxonómicas para flebótomos, basadas en estructuras de su genitalia y estructuras reproductivas internas, requiere entomólogos con probada experiencia. Las herramientas moleculares resultan aquí de gran apoyo, al poder aplicarse sobre partes del espécimen, en ambos sexos, y en diferentes estadios de desarrollo del mismo. Se estudian, principalmente, genes mitocondriales del vector como *COI* y *cytb* (Casiraghi *et al.*, 2010; Hebert, Cywinska, Ball, *et al.*, 2003).

4.3.1.1.4. Genética de poblaciones del vector

La comprensión de la epidemiología de una enfermedad transmitida por vector requiere del conocimiento de la biología de todos los organismos implicados (patógeno, reservorio y vector). Los estudios de genética de poblaciones proporcionan información sobre el estatus taxonómico de las especies, los límites espaciales de sus poblaciones y la existencia de flujo genético entre ellas. El estudio de marcadores moleculares polimórficos y su distribución dentro de un conjunto predefinido de individuos (genética de poblaciones) permiten comprender muchas características ecológicas de las poblaciones estudiadas, incluyendo sus modos y estrategias de reproducción, su dispersión y propagación espacio-temporal, así como el tamaño y estructura de las mismas

(McCoy, 2008). Los trabajos dirigidos a obtener este tipo de información, en el ámbito de la leishmaniasis, están aún en una fase muy inicial.

4.3.1.2. Investigación molecular en el parásito

Como se ha descrito con anterioridad, las herramientas moleculares se aplican al estudio del polimorfismo genético del parásito. Dicho estudio facilita la identificación de especies de *Leishmania* y subtipado de las mismas. Se pueden estudiar grupos de genes y su expresión para obtener información sobre la virulencia o la resistencia a fármacos. Y aplicando herramientas de filogenia y genética de poblaciones se puede contribuir a la resolución de problemas epidemiológicos.

4.3.1.2.1. Identificación de especie y variabilidad intraespecífica

Puesto que no hay asociación unívoca entre la especie de *Leishmania* y el cuadro clínico, la identificación de especie es crucial para establecer el pronóstico de la infección y establecer el tratamiento más adecuado. Cuando distintas especies de *Leishmania* son co-endémicas, su identificación es una pieza clave para comprender los distintos ciclos de transmisión y establecer medidas de control adecuadas. Son varias las regiones del genoma de *Leishmania* estudiadas para este propósito, desde los minicírculos del ADN mitocondrial hasta genes y regiones no codificantes del ADN nuclear. Actualmente se considera que la secuenciación de un fragmento interno de aproximadamente 1400 bp del gen que codifica la proteína de choque térmico de 70KDa (*HSP70*) de *Leishmania* proporciona la mejor información para el diagnóstico de especie (Fraga *et al.*, 2010). La secuencia del espaciador transcrito interno-1 (ITS1) es especialmente útil en las especies de *Leishmania* del hemisferio oriental (Schönian *et al.*, 2003).

Por otra parte, el polimorfismo en determinados genes de *Leishmania* también se ha asociado al diferente comportamiento de algunas técnicas diagnósticas en distintas áreas endémicas. Un claro ejemplo es el polimorfismo de un gen de la familia de las kinesinas, un fragmento de este gen que incluye una secuencia repetida de 39 aminoácidos forma parte del test rápido rK39 (rK39-ICT), utilizado en el diagnóstico serológico de la LV. Si bien este test es extremadamente sensible en el subcontinente indio, en el este de África muestra una sensibilidad inferior. Este distinto desempeño se asocia a diferencias en la secuencia entre los homólogos K39 en las cepas de *L. donovani* del este de África y del subcontinente indio (Bhattacharyya *et al.*, 2013).

4.3.1.2.2. Genética de poblaciones del parásito

El análisis de los datos generados por la mayoría de herramientas moleculares con aplicación en epidemiología se lleva a cabo mediante dos aproximaciones principales: genética de poblaciones o filogenia. Los estudios de genética de poblaciones permiten obtener una ‘fotografía instantánea’ de la estructura actual teniendo en cuenta la variabilidad genética dentro de una misma población y entre poblaciones distintas, mientras que los análisis filogenéticos se centran en la ‘historia’ y relaciones evolutivas de las poblaciones en una línea de descendencia. Estas aproximaciones dependen del empleo de marcadores neutrales no afectados por los mecanismos de selección natural. Aunque en ocasiones el uso de marcadores no-neutrales permite definir factores específicos de cada cepa como factores de virulencia o atributos relacionados con una mayor capacidad de transmisión.

Entre las estrategias más interesantes actualmente y con mayor proyección de futuro están el *MultiLocus Sequence Typing*, o *MultiLocus Sequence Analysis* (MLST o MLSA), que han permitido identificar estructura de poblaciones geográfica y jerárquicamente en *Leishmania*; acción necesaria para comprender los patrones de propagación de las distintas poblaciones del parásito y el origen de las poblaciones implicadas en un brote (Boite *et al.*, 2012; El Baidouri *et al.*, 2013; Marlow *et al.*, 2014).

4.3.1.3. Hacia un sistema integrado de vigilancia molecular

El empleo de técnicas de biología molecular tiende ya a formar parte de los sistemas de vigilancia de agentes infecciosos. De hecho, el *European Surveillance System* (TESSy) *Molecular Surveillance Service* (MSS) del ECDC fue introducido en el año 2012, inicialmente incorporando datos de agentes infecciosos bacterianos, y sin contemplar por ahora ninguna de las enfermedades infecciosas transmitidas por vector (Van Walle, 2013). La creciente preocupación por la propagación de la leishmaniasis en Europa, exige del desarrollo de un sistema de vigilancia molecular integrado que permita el estudio y seguimiento de las poblaciones de *L. infantum* y sus vectores flebótomos, una aplicación racional de las herramientas de biología molecular permitiría determinar la estructura de poblaciones de parásito y vector y los rangos de distribución y migración de los mismos, así como identificar las poblaciones implicadas en nuevos brotes y entender su origen.

Siendo una enfermedad transmitida por vector, es importante que un sistema de vigilancia molecular de la leishmaniasis aborde desde un punto de vista integrado el estudio del binomio parásito-vector.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es endémica en la cuenca mediterránea, afectando al menos a nueve países de la Unión Europea. Sin embargo, en la mayoría de los países endémicos continúa siendo una enfermedad olvidada con un bajo índice de notificación, dando lugar a una subestimación del número de casos. Actualmente esta enfermedad se encuentra en una situación de (re-)emergencia a nivel europeo observándose una evidente propagación hacia el norte, registrándose brotes en países endémicos, así como la presencia de vectores, reservorios infectados y la sospecha de los primeros casos autóctonos en países considerados hasta la fecha como no endémicos. Un ejemplo de esta situación de re-emergencia es España, donde recientemente se han registrado un brote urbano de leishmaniasis cutánea y visceral en la Comunidad Autónoma de Madrid de una magnitud sin precedentes en Europa, así como la propagación de la leishmaniasis canina hacia el norte del país. Es necesario, por tanto, mantener un sistema de monitorización a nivel nacional y transnacional. Siendo el desarrollo e implementación de estrategias dirigidas a mejorar la vigilancia de la leishmaniasis uno los objetivos planteados por la Oficina Regional de la OMS para contribuir a controlar la leishmaniasis en la región de cara a 2020 (Gradoni, 2013; WHO, 2014).

En este sentido, las técnicas de biología molecular se están empleando cada vez más en el estudio de la epidemiología de distintas enfermedades, infecciosas o no. Esta estrategia ya está siendo usada por el CDC europeo (ECDC), que introdujo el *European Surveillance System (TESSy) Molecular Surveillance Service (MSS)* en el año 2012, aplicado inicialmente al estudio de agentes infecciosos bacterianos (Van Walle, 2013). De momento este sistema no incluye, de manera específica, ninguna enfermedad transmitida por vector. Sin embargo, el conocimiento actual que se tiene sobre la leishmaniasis permite establecer un sistema de vigilancia molecular integrado para estudiar y seguir las poblaciones de *Leishmania* y sus vectores, determinar los sus rangos de distribución y propagación, así como identificar las poblaciones implicadas en nuevos brotes y entender su origen.

OBJETIVOS

En este contexto nos planteamos el **objetivo general** de la presente tesis doctoral, que es validar una serie de herramientas de tipado molecular de *Leishmania* y sus vectores para establecer las bases de un sistema de vigilancia molecular de la leishmaniasis en España y con potencial aplicación en Europa y la cuenca mediterránea.

Con el fin de abordar el objetivo general, nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**, que conforman los 5 capítulos de esta tesis doctoral:

Capítulo 1 | Tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* implicados en el brote de leishmaniasis en el suroeste de la Comunidad Autónoma de Madrid, España 2008-2012.

- Validar los marcadores moleculares ITS y *k26* para caracterizar aislados de *L. infantum* en el contexto de un brote.

Capítulo 2 | Caracterización molecular de cepas de *L. infantum* aisladas de humanos, perros y flebótomos, España 1986-2015.

- Identificar y estudiar la distribución espacio temporal de los genotipos ITS y K26 asociados a la leishmaniasis en España.
- Caracterizar las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los fragmentos del gen que codifica para el antígeno K26

Capítulo 3 | Estudio de la estructura de poblaciones de *L. infantum* mediante el análisis de secuencias multilocus (*Multilocus sequence analysis-MLSA*).

- Validar el uso de un sistema más completo y universal de tipado molecular (MLSA) para determinar la frecuencia, distribución y composición de secuencias tipo en las poblaciones de *L. infantum*.

Capítulo 4 | Identificación molecular de los flebótomos de la región mediterránea mediante el análisis de la secuencia de ADN de los genes *cytb* y *nd1*.

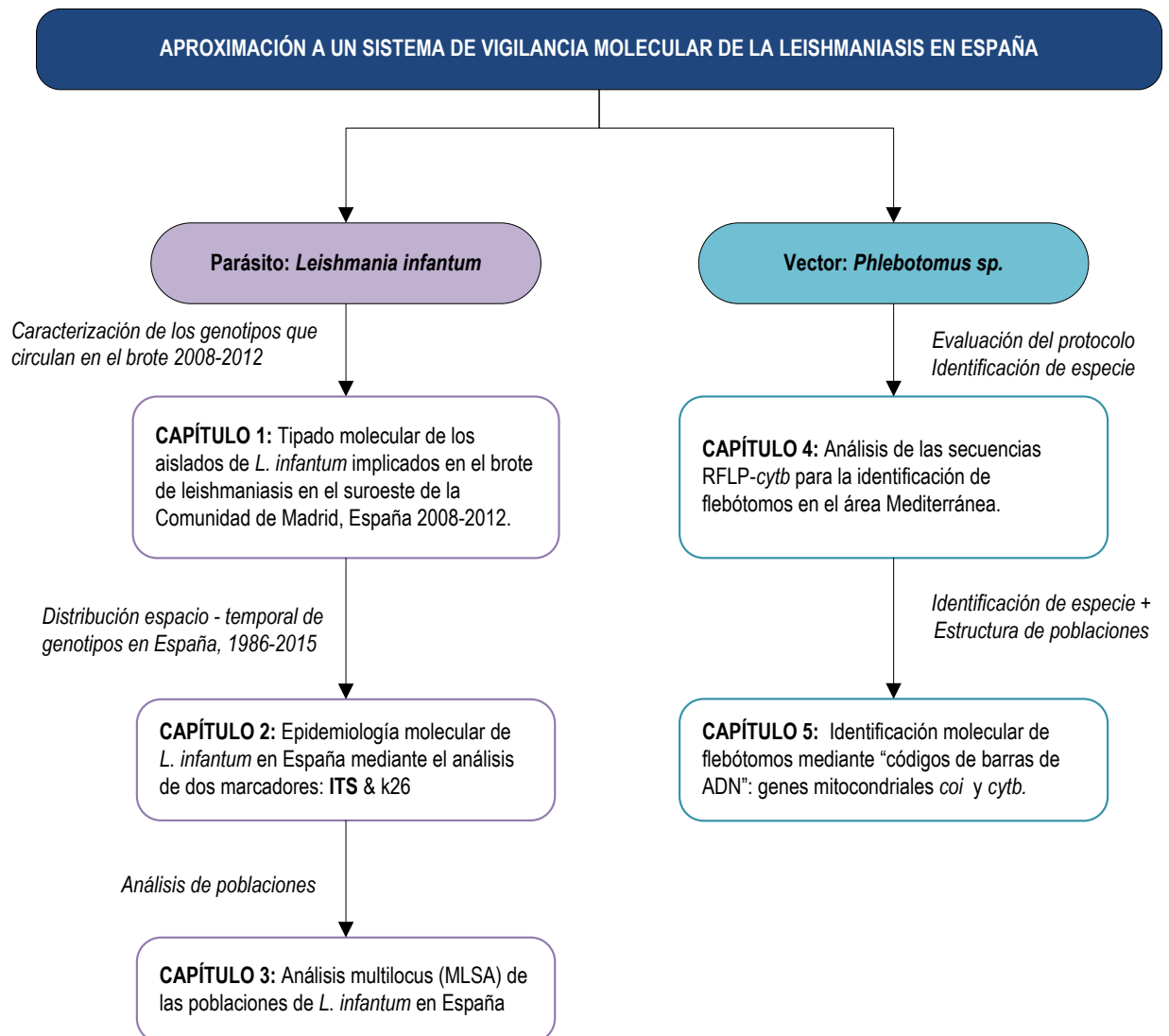
- Evaluar la utilidad del método basado en el análisis mediante PCR-RFLP de los genes *cytb* y *nd1* para la identificación de especies de flebótomos de la región mediterránea.

Capítulo 5 | Aplicación de la metodología de código de barras de ADN (*DNA Barcoding*) para la identificación molecular de especies de flebótomos de la cuenca mediterránea.

- Validar la metodología *DNA barcoding* basada en los genes mitocondriales *cytb* y *coi* para la identificación de especies de flebótomos de la región mediterránea.

III. MATERIALES & MÉTODOS

ESQUEMA DE TRABAJO



1. Descripción de la muestra para los estudios en el parásito.

1.1. Cepas de *Leishmania infantum*

Los aislados de *L. infantum* utilizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se obtuvieron de la colección del Centro Colaborador de la OMS para leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (CNM-ISCIII), Majadahonda, Madrid. De manera retrospectiva se analizaron un total de 550 aislados *L. infantum* procedentes de diferentes zonas de España. Con el propósito de garantizar la máxima diversidad en las cepas, los criterios de selección fueron: el hospedador, el origen geográfico, el año de aislamiento y la variabilidad a nivel de zimodema. Este panel incluyó (Figura 25):

- 475 aislados de humanos
- 65 aislados de perros
- 10 aislados de flebótomos

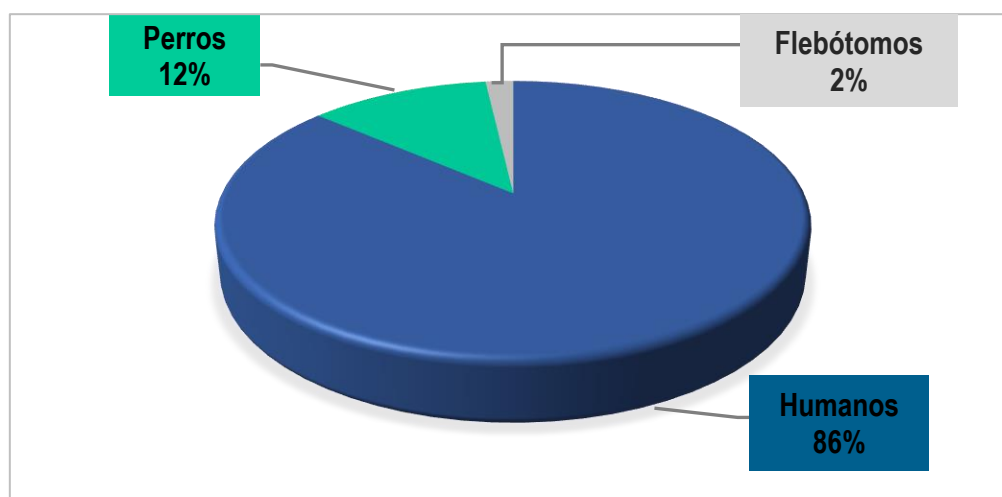


Figura 25. Aislados de *L. infantum* utilizados en esta Tesis Doctoral, en función del hospedador del que fueron obtenidos.

Todos los aislados de origen humano se obtuvieron entre 1986 y 2013 como parte de las tareas de diagnóstico de rutina. Los aislados de origen canino provienen de distintos estudios epidemiológicos y ensayos clínicos. Los aislados provenientes de *P. perniciosus* fueron cedidos gentilmente por la Unidad de Entomología Médica (ISCIII), los cuales se obtuvieron en el marco de uno de sus estudios epidemiológicos.

En la Tabla 7, se representa el número de aislados según su origen geográfico y hospedador. Todas las áreas se consideran endémicas, excepto las de latitud norte (Galicia y Castilla y León).

Las cepas utilizadas en esta Tesis Doctoral varían en función del capítulo a tratar, los datos demográficos, clínicos y epidemiológicos de la totalidad de cepas empleadas están detallados en los Anexos 1, 2 y 3.

Tabla 7. Distribución de los aislados de *L. infantum* según el hospedador y su origen geográfico.

Hospedador	Origen geográfico	No. de aislados
Humano (n= 475)	Andalucía	33
	Castilla La Mancha	11
	Castilla y León	3
	Cataluña	26
	Extremadura	5
	Galicia	2
	Islas Baleares	44
	Comunidad de Madrid	329
	Comunidad Valenciana	22
Perro (n= 65)	Andalucía	5
	Cataluña	5
	Islas Baleares	1
	Comunidad de Madrid	47
	Comunidad Valenciana	7
Flebótomo (n=10)	Comunidad de Madrid	10

Entre las 475 cepas de *Leishmania*, hubo 387 casos (81%) de leishmaniasis visceral, 81 casos de leishmaniasis cutánea (17%), 5 casos (1.05%) de leishmaniasis ganglionar (linfadenopatía) y 2 casos (0,5%) de leishmaniasis mucocutánea (Figura 26). En cuanto al estado inmunológico, se cita la condición de portador o no del virus de inmunodeficiencia humana, dada su importancia en la epidemiología de la leishmaniasis en España. El 27% (130) de las cepas se aislaron de pacientes inmunocompetentes, mientras que el 54% (257) se aislaron de individuos VIH positivos. Para 87 aislados (18,5%) se desconoce el estado inmune del hospedador (Figura 26). Estas variables se tuvieron en cuenta con el fin de integrar los datos clínicos, epidemiológicos y moleculares en el análisis de hipótesis, y la búsqueda de asociación de genotipo/fenotipo en los ensayos que se llevaron a cabo.

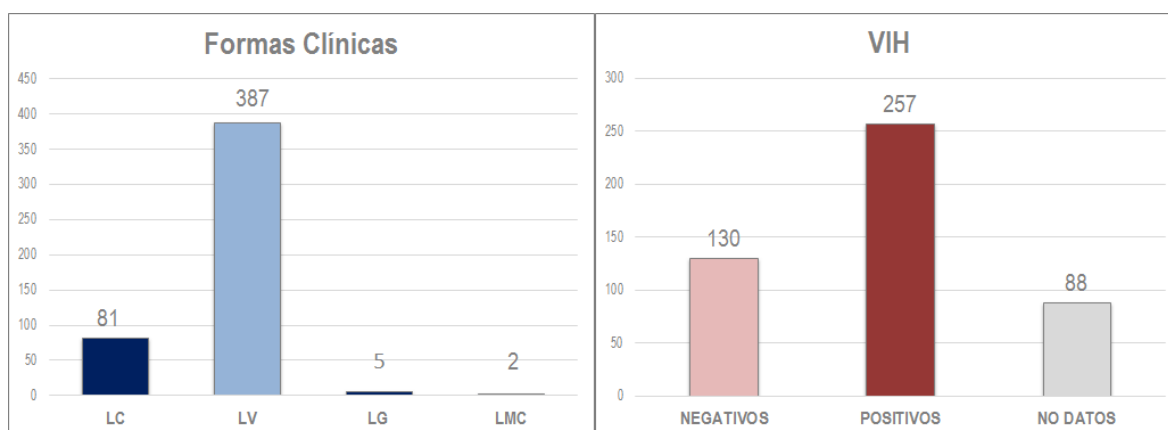


Figura 26. Características clínicas de los pacientes de los que se aislaron las cepas de *L. infantum* estudiadas. A la izquierda, las formas clínicas de la enfermedad. **LC**= Leishmaniasis cutánea; **LV**= Leishmaniasis visceral; **LG**: Leishmaniasis ganglionar o linfadenopatía; **LMC**= Leishmaniasis mucocutánea. A la derecha se representa el número de casos respecto a la infección por VIH.

Las 475 cepas aisladas de humanos provenían de 469 pacientes: 69% hombres y 16% mujeres, mientras que en el 15% restante de la muestra se desconocía el género del que se obtuvo el material (Tabla 8). Por otra parte, el 7.8 % eran casos en menores con edades entre 0-15 años, mientras que el 64.2% de los casos sucedieron en adultos que variaron entre los 19 y 93 años. El 28% restante fueron casos en los que no se identificó la edad.

Tabla 8. Características de la población de la cual se obtuvieron los aislados clínicos del parásito ($n=475$).

	Población						Totales	
	Infantil		Adulta		Edad desconocida			
Género	Nº de casos	%	Nº de casos	%	Nº de casos	%	Nº de casos	%
Hombre	22	4.6	200	42.1	105	22.1	327	69
Mujer	14	3.0	47	9.9	15	3.2	76	16
n. d	1	0.2	58	12.2	13	2.7	72	15
Total	37	7.8	305	64.2	133	28	475	100

n.d: no existen datos

De las 550 cepas de *L. infantum* incluidas en este trabajo 344 (de origen humano y canino) estaban previamente tipadas mediante análisis de isoenzimas y clasificadas en 22 zimodemas distintos, de los cuales 173 cepas pertenecían al zimodema MON-1 y 71 al zimodema MON-24, los principales zimodemas descritos en España. Los datos de tipificación mediante la técnica de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) no estaban disponibles para 206 cepas. La tipificación mediante MLEE y la crioconservación de todas las cepas se realizó en el Centro Colaborador de la OMS para leishmaniasis (Tabla 9).

Tabla 9. Zimodemas de 344 de los aislados de *L. infantum* incluidos en este estudio.

Variabilidad Isoenzimática		
Zimodema	Humanos	Perros
MON-1	132	41
MON-24	71	-
MON-27	3	-
MON-28	5	-
MON-29	9	-
MON-33	7	-
MON-34	33	-
MON-77	-	1
MON-80	3	-
MON-105	2	-
MON-108	1	-
MON-183	10	-
MON-190	1	-
MON-198	1	-
MON-199	1	-
MON-253	9	1
MON-273	-	1
MON-282	1	-
MON-283	1	-
MON-284	2	-
MON-285	1	-
MON-302	7	-

1.2. Cepas de referencia

Se utilizaron dos cepas de referencia de *L. infantum* en este estudio: MHOM/FR/78/LEM-75, una cepa aislada de humano en 1978, originaria de Francia, y tipada como zimodema MON-1; y una segunda cepa MCAN/ES/98/LLM-724 aislada de perro en España en 1998, zimodema MON-1.

2. Condiciones de cultivo de *Leishmania* en medio *Novy-McNeal-Nicolle* (NNN)

El aislamiento del parásito se llevó a cabo a partir de muestras biológicas de pacientes, perros y flebotomos. La preparación detallada del medio NNN modificado se describe a continuación:

1. Preparación del Agar: Disolver en 450 ml de agua destilada, 10 g de agar bacteriológico (Pronadisa, Laboratorios CONDA, España) y 3 g de NaCl. Autoclavar la solución (120°C a 1 atmósfera de presión durante 20 min) y conservar a 4°C hasta su utilización.
2. Preparación de la sangre de conejo: Desfibrinar sangre de conejo utilizando perlas de vidrio y agitación moderada (proporción 1:2 con el agar). Conservar a temperatura ambiente si va a utilizar en el mismo día, o a 4°C un periodo máximo de 24 horas.
3. En el momento previo a preparar el medio NNN, fundir el agar bacteriológico en microondas y dejar enfriar en baño de María hasta 50°C.
4. Preparar tubos estériles para cultivo de 10 ml y con tapón de rosca (Cellstar, Greiner Bio-one).
5. Preparación del medio NNN: Mezclar 100 ml de agar, 50 ml de sangre de conejo desfibrinada y 10 ml de solución de antibióticos (Penicilina Estreptomicina 10.000 U/ml (PEN-STREP) (LONZA, Verviers, Bélgica).
6. Añadir en cada tubo 2 ml de esta mezcla manteniendo los tubos inclinados hasta que el agar solidifique formando “pico de flauta”. Los tubos pueden conservarse a 4°C durante 15 días.
7. Incubar uno de los tubos a 37°C durante 24-48 horas y examinar para comprobar la esterilidad del lote.

2.1. Inoculación en medio de cultivo

En el momento de proceder al cultivo, se añade al medio NNN la fase líquida que consiste en 100 µl de RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor (SBFI) al 10% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU). El inóculo de la muestra se realiza añadiendo a un tubo de cultivo atemperado 50-100 µl de la muestra de médula ósea, sangre o cualquier otro fluido. En el caso de que la muestra sea una biopsia de tejido, esta se homogeniza previamente usando como diluyente NET-10 (NaCl 10 mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 10mM, pH 8).

Los tubos de medio NNN inoculados se mantienen a 27°C y se supervisan cada siete días bajo observación microscópica. Se realizan pases semanales en nuevos tubos con medio NNN, transfiriendo en su totalidad el inóculo inicial. Si después de 4 pases no se observan promastigotes al microscopio, el cultivo se considera negativo. La observación de promastigotes, constituye un resultado positivo.

2.2. Obtención de cultivos en masa para la colección

Para conseguir cultivo en masa de promastigotes, pasamos un inóculo del cultivo en medio NNN a frascos de cultivo celulares estériles de 50 cm² (Corning), añadiendo a estos 10 ml de medio de cultivo NNN, 5 ml de RPMI suplementado con SBFI y la solución de antibióticos (10.0000 U/ml de penicilina y estreptomicina). Tras mantener el cultivo a 27°C durante 3-4 días, hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, la fase líquida se recoge y centrifuga a 1900 g durante 10 minutos a 4°C para sedimentar los promastigotes. El sedimento obtenido se resuspende en el medio de congelación para su posterior crioconservación. Todos los cultivos fueron realizados en un laboratorio de nivel de bioseguridad 2 con una cabina de flujo laminar de tipo II, como indican las guías de buenas prácticas en la NTP 520 frente a la prevención del riesgo biológico en el laboratorio.

2.3. Condiciones de crioconservación de los aislados de *Leishmania*

Para garantizar al máximo la viabilidad y estabilidad genética por períodos de tiempo prolongados y mantener una colección de aislados, se procede a la crioconservación en nitrógeno líquido de los aislados de *Leishmania*. El protocolo que se llevó a cabo se describe a continuación:

1. Iniciar con aproximadamente 50 ml de cultivo de promastigotes en medio NNN-RPMI. Concentrar mediante centrifugación (1900g, 10 min a 4°C).
2. A partir de este paso todo el procedimiento se debe realizar y hielo. Retirar el sobrenadante y resuspender el cultivo concentrado en 6 ml de medio de congelación que contenga un crioprotector como el dimetilsulfóxido (DMSO) (RPMI completo 70%, 10% Suero Bovino Fetal inactivado 20% DMSO).
3. Transferir a criotubos estériles (1 ml/tubo).
4. Congelar de manera gradual (-1°C/min) utilizando un recipiente para congelación lenta Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene, Nueva York, Estados Unidos).
5. Mantener a -70°C durante 24 horas (en caja de poliespan).
6. Pasar a Nitrógeno líquido (-196°C).

2.4. Preparación de las cepas de *L. infantum* para la extracción de ADN

1. Descongelar las cepas que se han alicuotado a partir de cultivos concentrados de aproximadamente 2.5×10^7 promastigotes (descongelar 1 criotubo por cepa).
2. Transferir todo el contenido del criotubo a un tubo *Eppendorf*® de rosca de 1.5 ml (TER).
3. Centrifugar 6000 rpm, durante 10 min para concentrar los promastigotes.

4. Eliminar el sobrenadante con micropipeta.
5. Añadir al sedimento 400 µl de NET-10 estéril y resuspender.
6. A continuación, pasar 200 µl de la suspensión a un nuevo TER para la extracción de DNA.
7. Congelar el resto de la suspensión a -20°C, por si fuese necesario volver a extraer material genético.

3. Descripción de la muestra para los estudios en el vector

3.1. Flebótomos

El material de partida empleado en nuestros análisis moleculares consistió mayoritariamente en el ADN genómico de 155 especímenes colectados en diferentes regiones españolas.

3.1.1. Área de estudio

En la naturaleza existen diversos escenarios que condicionan o no la presencia y distribución de los flebótomos. España es un país transcontinental situado en el sur-oeste de Europa y en el norte de África, dando lugar a una importante variedad de regiones, y en estas la representación de diversos pisos bioclimáticos. Acorde con dicha distribución y en colaboración con el equipo de entomología del grupo Epicontrol carnívoros del Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria (UCM), los dípteros se recolectaron en 11 localidades repartidas entre la Península Ibérica (PI) y el archipiélago de las Islas Baleares (IB). Los muestreos entomológicos son representativos de tres pisos bioclimáticos de España (Supramediterráneo, Mesomediterráneo y Termomediterráneo), donde se encuentran especies de *Phlebotomus*, de acuerdo a registros previos (Rivas-Martínez, 1983). Cabe señalar que no se han incluido sitios de muestreo en los pisos Crioromediterráneo y Oromediterráneo debido a que ambos presentan unos rangos de altitud en los que no se distribuyen los flebótomos (Tabla 10)

En total se colectaron 155 especímenes, las especies, origen geográfico, coordenadas de sitios de captura y códigos de acceso a la colección se detallan en la Tabla 40 del Capítulo 4. Los puntos de muestreo se han representado sobre un mapa de pisos bioclimáticos de la PI e IB (ver más adelante en Figura 46 del capítulo 4).

Tabla 10. Características de los pisos mediterráneos en la Península Ibérica e Islas Baleares y número ejemplares muestreados.

Piso	Área (Ha)	Altitud mínima (m)	Altitud máxima (m)	Altitud media (m)	Número de especímenes
Crioromediterráneo	9.059	1.792	3.452	2.548	0
Oromediterráneo	456.908	1.008	3.296	1.757	0
Supramediterráneo	14.595.852	88	2.427	961	46
Mesomediterráneo	21.239.216	0	1.860	560	48
Termomediterráneo	4.170.835	0	1.391	173	61

3.1.2. Métodos de captura

Los ejemplares fueron colectados entre los meses de junio y octubre de 2013. Para las capturas de flebótomos se utilizaron trampas de luz CDC (John W. Hock, Company, Gainesville, EE.UU). Estas trampas constan de un cilindro de metacrilato conectado a una batería de 6 voltios; la batería hace funcionar una pequeña bombilla y una hélice aspiradora situados en el extremo superior del cilindro. Por el otro extremo de la trampa se acopla una bolsa de tul en la que se van recogiendo los insectos (Figura 27). La luz de la bombilla atrae a los insectos debido a que presentan una atracción hacia la luz artificial, y cuando estos están cerca de la boca de la trampa la hélice los aspira hacia el interior de la bolsa de tul e impide que vuelvan a salir. Este sistema permite capturar vivos a los flebótomos.

**Figura 27.** Trampa de luz CDC.

Dependiendo del lugar de muestreo, se colgaron una o varias trampas durante el periodo de actividad crepuscular de los flebótomos, que se inicia tras la puesta de sol y se prolonga durante las primeras horas de la noche (Miró & Molina, 2006). Las trampas se dejaron funcionando desde las 18:00 hasta las 07:00 horas del día siguiente. Todos los datos de cada trampa fueron recogidos en el formulario de recogida de datos para captura de Flebótomos.

3.1.3. Procesamiento del material entomológico e identificación morfológica de flebótomos.

Después de la captura, los individuos se almacenaron en viales individuales utilizando tubos cónicos *Eppendorf*® de 1,5 ml con alcohol 70% adecuadamente marcados para su posterior procesamiento. De cada localización separamos los flebótomos del resto de los insectos y dentro de los primeros los machos de las hembras (Figura 28).

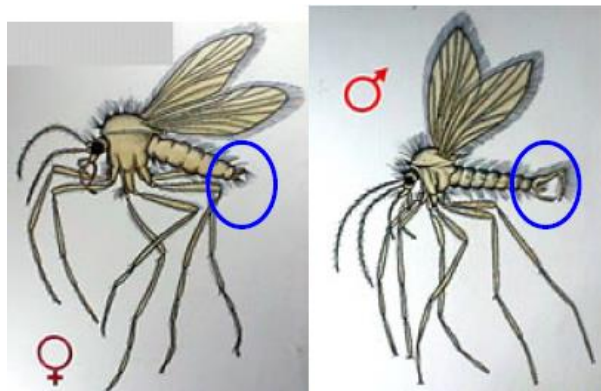


Figura 28. Principales características diferenciales entre flebótomos hembras y machos.

Las disecciones e identificaciones morfológicas correspondientes se realizaron en colaboración con el equipo de entomología del Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria (UCM). Brevemente, bajo estereomicroscopio y en una gota de solución salina, se diseccionó la cabeza y el último segmento del abdomen de cada espécimen. El resto del tórax y las patas se removieron cuidadosamente para la extracción de ADN, manteniéndose a -20 °C en tubos tapa rosca con etanol al 70% para su posterior análisis molecular. La identificación taxonómica se basó en el examen de la armadura genital de los machos y de las espermatecas y el cibario de las hembras, según las claves taxonómicas de Gallego-Berenguer *et al.*, (1992) y Gil-Collado *et al.*, (1989). Para facilitar la observación de las estructuras anatómicas en las que se basa la clasificación de los flebótomos, estos han de someterse a un proceso de aclarado. Para ello, se incluyeron las hembras de flebótomos en solución de Mark André (mezcla de ácido acético, hidrato de cloral y de agua destilada, (Abbonnenc, 1972), en TER que se calentaron en un termobloque a 60°C durante 50 min para acelerar el proceso de aclarado de la cutícula. Para la observación morfológica detallada y verificación taxonómica tanto de las hembras como de los machos, las partes correspondientes se montan entre porta y cubreobjetos con medio de Hoyer (mezcla de goma arábiga, hidrato de cloral, glicerina y agua destilada, Upton, 1993). Una vez realizado el montaje, se procedió a su observación en un microscopio óptico. Los especímenes testigo están depositados en la Colección de Artrópodos de la Facultad de Veterinaria de la UCM,

en Madrid, España. Para el análisis y la comparación de los resultados obtenidos en los estudios dedicados a la vigilancia molecular del vector se incluyeron secuencias de ADN de los genes de interés, todas ellas obtenidas a partir de la base de datos no redundante del GenBank, disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Las especies y número de secuencias analizadas por gen se detallan en los Capítulos 4 y 5.

4. Obtención de ácidos nucleicos totales a partir de cultivos y de tejidos

4.1. Extracción de ADN genómico

El aislamiento de ADN genómico de cada una de las cepas de *Leishmania* y de los flebótomos empleados en este estudio, se llevó a cabo utilizando el kit comercial Kit QIAmp® DNA mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). La técnica de extracción de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 29), las cuales comprende 4 etapas:



Figura 29. Esquema de extracción de ADN usando el Kit QIAmp® DNA mini Kit de QIAGEN.

- a) **Lisis Celular:** A partir de 200 µl de la suspensión de promastigotes en NET-10 que se obtuvo del cultivo en masa criopreservado (descrita en el apartado xx) en un TER, se procede a la lisis celular y liberación del ADN del parásito. Para esto, se añade 200 µl del tampón ATL que contiene sales caotrópicas (hidrocloruro de guanidina) que ayudan a romper la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos, consiguiendo su desnaturalización, esto junto con la adición de un detergente elimina las membranas. Posteriormente, se agrega 20 µl de proteinasa K (20 mg/ ml), la cual permite la degradación de la fracción proteica asociada al ADN. Se mezcla por agitación, e incuba a 56° C durante 20 min. Junto con las muestras, se realiza la extracción de un control negativo (agua destilada estéril).

b) Unión del ADN genómico a la membrana de la columna de centrifugación *QIAamp Mini*:

Para optimizar la unión del ADN genómico a la membrana de la columna de centrifugación *QIAamp Mini* se añade en primer lugar 200 μ l de etanol absoluto (96-100%) a los lisados. Se mezcla por agitación para precipitar el ADN mediante la formación de enlaces iónicos. El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar y recuperar mediante una centrifugación. La mezcla se transfiere a una columna *QIAamp Mini*, incorporada en un tubo colector de 2 ml. Se centrifuga a 13.000 rpm durante 1 min. A medida que el lisado atraviesa la membrana por efecto del vacío o de la fuerza centrífuga, el ADN genómico se adsorbe sobre la membrana de gel de sílice y la fuerza de la centrífuga decanta los restos celulares, proteínas y demás metabolitos en el tubo recolector.

c) Lavado de la membrana y purificación del ADN: Se coloca la columna *DNeasy mini spin* en un nuevo tubo colector de 2ml, para continuar con los lavados del ADN. A continuación, se añade en la columna 500 μ l Buffer AW1 (sal caotrópica de hidrocloreuro de guanidina y etanol), y se centrifuga durante 1 min a 13.000 rpm, con el fin de eliminar contaminantes e inhibidores enzimáticos. Se descarta nuevamente el tubo colector y se incorpora la columna en un tubo nuevo. Se agrega 500 μ l de Buffer AW2 (conservante azida sódica y etanol), se centrifuga durante 3 min a velocidad máxima para secar la membrana de la columna *QIAamp DNA*. Se descarta el tubo de recolección. Se repite esta última centrifugación con otro tubo colector para garantizar la eliminación de cualquier resto de buffer y etanol que pueda interferir en las reacciones posteriores.

d) Elución del ADN genómico de la membrana: Finalmente se coloca la columna en un nuevo TER estéril 1.5 - 2 ml y se añade 200 μ L de H₂O mili-Q estéril directamente a la membrana. Se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto, y luego se centrifuga durante 1 min a 6000 g. El eluido contiene el ADN genómico.

Nota: Para la extracción de ADN de los flebotomos, se realizaron algunas modificaciones que se describen en el apartado 2.3 del Capítulo 4.

4.1.1. Cuantificación del ADN

Una vez obtenido el ácido nucleico del parásito, es importante determinar el rendimiento de la técnica de aislamiento de ADN mediante espectrofotometría en cada una de los aislados. La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría.

Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (DO), en el caso del ADN genómico de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 µg/ml.

La concentración del ADN extraído se cuantificó midiendo la densidad óptica a una absorbancia de 260 nm con el espectrofotómetro *NanoDrop Spectrophotometer* ND-1000 (NanoDrop Technologies®, Delaware, EE.UU) y comparando las mediciones con un blanco de H₂O mili-Q estéril, la misma en la que los ADN estaban eluidos. Considerando que para una reacción de PCR se requieren de 10 a 200 ng debemos obtener al menos, 5 ng/µl de ADN en cada muestra, concentraciones menores o incluso mayores dificultan la estandarización de la PCR u otras técnicas. Los valores obtenidos a partir de los cultivos concentrados varió entre 10 a 350 ng/µl con una media de 85 ng/µl. Todos los ADN se ajustaron a una concentración final de 10 ng/µl (5x10⁴ parásitos/µl) usando agua estéril en las diluciones, para su posterior análisis molecular.

La calidad del ADN se determinó por medida de la relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm considerándose material genético con alto grado de pureza valores cuyo ratio este comprendido entre 1,8 y 2. Para estimar la pureza del ADN se considera la relación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una relación de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas u otros contaminantes. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol.

5. Técnicas de caracterización molecular

Mediante distintos protocolos de PCR se amplificaron las diferentes regiones del genoma del parásito *L. infantum* y del vector *Phlebotomus* spp. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un termociclador convencional de la marca *Applied Biosystems PCR System 2720* y solo en el caso particular de la amplificación del gen *cytb* del flebótomo se utilizó un equipo diferente, el Termociclador *GeneAmp PCR System 9800Fast* (*Applied Biosystems*®). En todas las amplificaciones se incluyeron dos controles negativos que contenían todos los componentes de la mezcla de PCR excepto el ADN que fue sustituido por agua destilada. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Microbiología (ISCIII).

5.1. Técnicas de caracterización molecular en *L. infantum*

5.1.1. Identificación de especies de *Leishmania* mediante PCR -ITS1

La identificación de la especie de *Leishmania* se realiza mediante una PCR anidada (nPCR) que amplifica una región del espaciador transcrito interno -1 (ITS1) del ADN ribosomal de *Leishmania*. Esta región separa los genes que codifican para la subunidad pequeña del ribosoma (SSU: *Small subunit ribosomal*) y la subunidad 5.8S rRNA. La amplificación de la región ITS1 se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Schönian *et al.*, (2001) modificado utilizando en la primera reacción los cebadores LITSR (5'CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3') y L5.8S (5'TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT -3') diseñados por El Tai *et al.*, (2000). La segunda reacción usa los cebadores SAC (5'-CAT TTT CCG ATG ATT ACA CC-3') y VAN2 (5'-GCG ACA CGT TAT GTG AGC CG-3') diseñados por Cruz *et al.*, (2013). Los componentes y condiciones de la reacción se indican en la Tabla 11 y Tabla 12, respectivamente. El estudio de esta región es válido para la identificación de especies del parásito dado que se encuentran altos niveles de variación inter e intraespecie (El Tai *et al.*, 2000; Schönian *et al.*, 2003). Después de la primera reacción se observa un producto de 300-350 pb dependiendo de la especie. Si la carga parasitaria presente en la muestra clínica es baja, el producto de ésta no es visible y es necesario realizar una segunda PCR. Después de la segunda reacción de amplificación se obtiene un producto de 280-330 pb dependiendo de la especie de *Leishmania* de que se trate.

Tabla 11. Componentes de las reacciones anidadas de PCR-ITS1.

Componentes	Composición [C]	1ª reacción Vol. de reacción (50 µl)	2ª reacción Vol. de reacción (50 µl)
Tampón de reacción 10X (Biotools®)	750 mM Tris HCl pH 9.0, 500 mM KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM, 20 mM de MgCl ₂	5 µl	5 µl
dNTPs (Biotools®)	10 mM	1 µl	1 µl
Oligonucleótido LITSR (Sigma)	15 µM	1 µl	-
Oligonucleótido L5.8S (Sigma)	15 µM	1 µl	-
Oligonucleótido SAC (Sigma)	15 µM	-	1 µl
Oligonucleótido VAN2 (Sigma)	15 µM	-	1 µl
Tth ADN polimerasa (Biotools®)	1 U/µl	1.4 µl	1.4 µl
ADN	10 ng/µl	10 µl	10 µl*
Agua destilada estéril		30,6 µl	30,6 µl

* Dilución 1/40 del primer producto de PCR (5 µl en 200 µl de H₂O destilada estéril).

Tabla 12. Programa de amplificación de las reacciones de PCR ITS-1

	Desnaturali- zación Inicial	Ciclos 30X			Extensión final
		Desnatura- lización	Hibridación	Extensión	
Primera reacción	94°C 5 min	94°C 30 seg	53°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 5 min
Segunda reacción	94°C 5 min	94°C 30 seg	57°C 30 seg	72°C 30 seg	

5.1.2. Amplificación de las regiones ITS1 e ITS2

Entre los diferentes componentes que contiene el ADN ribosomal, las regiones ITS son ideales para la tipificación de especies (Schönian *et al.*, 2001, Kuhls *et al.*, 2005). La metodología aquí descrita permite amplificar las regiones que contienen los espaciadores internos transcritos -1 y -2 (ITS, por sus siglas en inglés “*internal transcribed spacers*”), los cuales se sitúan entre los genes del ADN ribosomal que codifican para las subunidades pequeña y grande. Como en la mayoría de los eucariotas, la región ITS-1 está situada entre los genes ribosomales 18S y 5.8S, mientras que la ITS-2 se encuentra entre los genes 5.8S y 28S (El Tai *et al.*, 2000) (Figura 30).

Para evaluar el polimorfismo de las 12 regiones microsatélites que contienen las regiones ITS1 e ITS2 en cepas de *L. infantum*, se siguió el protocolo de PCR descrito por Kuhls *et al.* (2005). La región ITS-1 (300 pb) se amplificó utilizando la pareja de cebadores LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') y L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCAC TT-3'), mientras que en la amplificación de la región ITS-2 (700pb) se emplearon los oligonucleótidos L5.8SR (5'-AAG TGC GAT AAG TGG TA-3') y LITSV (5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3'). Los componentes y condiciones para la reacción de PCR de las ITS1 y -2 se detallan en la Tabla 13 y Tabla 14.

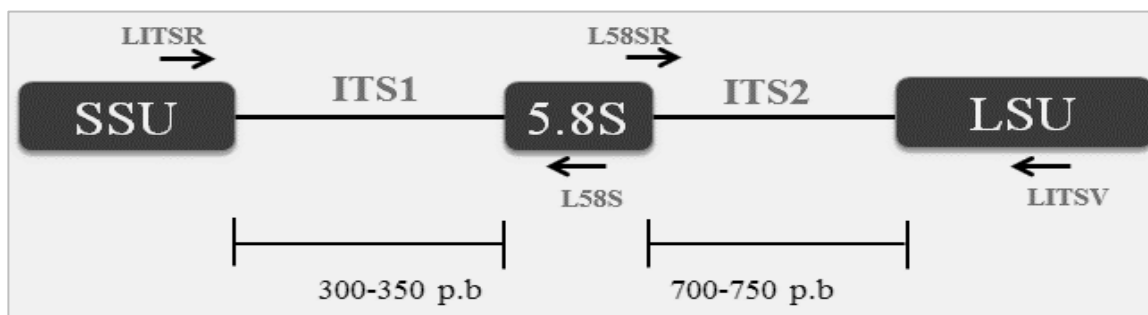
**Figura 30.** Representación del operón ribosomal indicando las regiones ITS1 e ITS2 y los oligonucleótidos empleados para la amplificación y caracterización molecular de las cepas de *L. infantum*.

Tabla 13. Componentes para las reacciones de PCR de las regiones ITS1 e ITS2.

Componentes	Composición [C]	Vol. de reacción (50 µl)
Tampón de reacción 10X (Biotools®)	750 mM Tris HCl pH 9.0, 500 mM KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM, 20 mM de MgCl ₂	5 µl
dNTPs (Biotools®)	10 mM	1 µl
Oligonucleótido sentido ^a (Sigma)	15µM	1 µl
Oligonucleótido anti-sentido ^b (Sigma)	15µM	1 µl
Tth ADN polimerasa (Biotools®)	1 U/µl	1.4 µl
ADN	10 ng/µl	5 µl
Agua destilada estéril		35.6 µl

^a : Oligonucleótidos sentido: LITSR en la ITS-1, y L58SR en la ITS-2

^b : Oligonucleótidos anti-sentido: L58S en la ITS-1, y LITSV en la ITS-2

Tabla 14. Programa de amplificación de las regiones ITS1 e ITS2. En ambas dianas moleculares se utiliza el mismo programa de amplificación.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	30
Hibridación	53	30 seg	
Elongación	72	30 seg	
Elongación final	72	10 min	1
Conservación	4	∞	

5.1.3. Amplificación y análisis de polimorfismo del gen *k26*

Se trata de una PCR para amplificar el ADN del gen que codifica para el antígeno *K26*. Dicha región permite discriminar entre las especies del complejo de *L. donovani* basados en el polimorfismo de la longitud del producto de PCR. Los tamaños esperados de los productos de PCR varían de 542 pb a ≤ 1300 pb. Los oligonucleótidos empleados en la reacción fueron: K26F (5'-ACGAAGGACTCCGCAAAG-3') y K26R (5'-TTCCCATCGTTTTGCTG-3'). La amplificación y posterior determinación del tamaño del amplicón se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Haralambous *et al.*, (2008), con algunas modificaciones como se describe en la Tabla 15 y Tabla 16.

Tabla 15. Componentes para la reacción de K26-PCR.

Componentes	Composición [C]	Vol. de reacción (50 μ l)
Tampón de reacción 10X (Biotools®)	750 mM Tris HCl pH 9.0, 500 mM KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM, 20 mM de MgCl ₂	5 μ l
dNTPs (Biotools®)	10 mM	1 μ l
Oligonucleótido K26F (Sigma)	15 μ M	1 μ l
Oligonucleótido K26R (Sigma)	15 μ M	1 μ l
Tth ADN polimerasa (Biotools®)	1 U/ μ l	1.5 μ l
ADN	10 ng/ μ l	5 μ l
Agua destilada estéril	-	35.5 μ l

Tabla 16. Condiciones de amplificación de la región que codifica para *K26*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	1 min	40
Hibridación	58	30 seg	
Elongación	72	2 min	
Elongación final	72	10 min	1
Conservación	4	∞	-

5.1.3.1. Análisis de la variabilidad aminoacídica del gen *k26*.

El antígeno *K26* también se conoce como la proteína de superficie hidrofílica acilada B (HASPB). Esta proteína posee una región repetitiva central compuesta por 14 aminoácidos altamente variables en *L. major* y en el complejo de *L. donovani*. La Figura 31 muestra un esquema de la composición de esta proteína y los oligonucleótidos usados para su amplificación.

La composición de péptidos que componen los dominios repetitivos del gen que codifica para el antígeno *K26* ha sido utilizada para el análisis del polimorfismo de esta región. Con el fin de describir la composición de esta proteína en cepas de *L. infantum* procedentes aisladas en España, las secuencias de nucleótidos de los fragmentos *K26* se tradujeron conceptualmente en secuencias de aminoácidos usando el programa Bioedit. De la combinación entre el tamaño de los productos de PCR y la secuencia aminoacídica, a los aislados se les asignó un grupo siguiendo el modelo descrito en el complejo de *L. donovani*. (Zackay *et al.*, 2013).

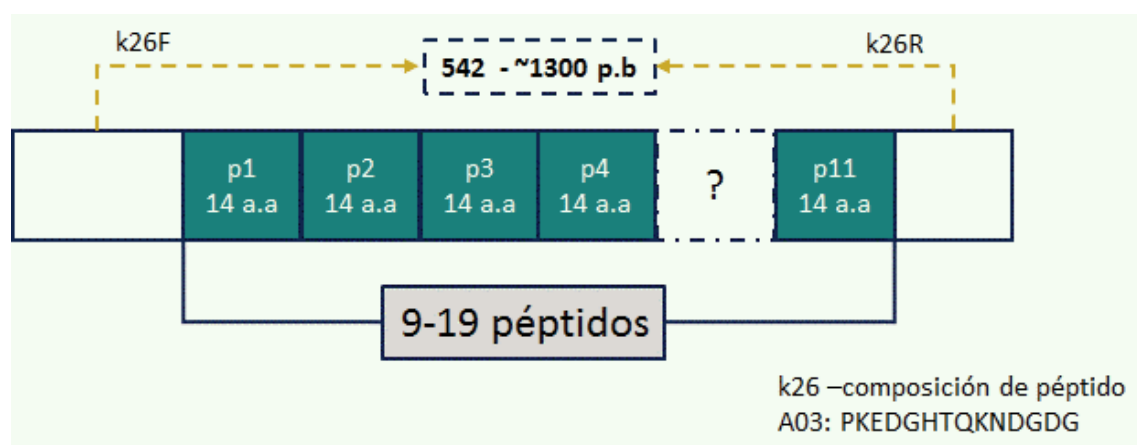


Figura 31. Organización de los péptidos que componen la región que codifica para el antígeno *K26*. El dominio central repetitivo dispuesto en tándem y compuesto por 14 aminoácidos representado como cuadros de color verde y un recuadro en blanco de líneas punteadas que representa el número de repeticiones variables que se pueden encontrar según el polimorfismo de esta diana. En líneas amarillas los oligonucleótidos de PCR (*K26F* y *K26R*) para lograr amplificar el fragmento. En la parte inferior derecha de la imagen se representa la composición de la secuencia del péptido A03, como ejemplo.

5.1.3.2. Amplificación de los genes que componen el sistema de análisis multilocus (MLSA)

Las regiones de ADN codificante (CDS) correspondientes a una serie de genes de mantenimiento (*housekeeping*) fueron amplificadas mediante PCR a partir del ADN de *L. infantum*. Estos genes se distribuyen a lo largo del genoma de *Leishmania*, localizándose en la región central o telomérica de seis cromosomas diferentes, por lo que se les considera como no ligados entre sí.

La amplificación mediante PCR se realizó para un panel de siete loci que codifican para:

- la subunidad alfa del factor de iniciación de elongación (030),
- la espermina sintasa (040),
- una proteína de tipo deshidrogenasa ligante de zinc (100),
- la subunidad alfa del Factor de iniciación de traducción (120),
- una proteína similar a la nucleósido hidrolasa (140),
- la proteína hipotética (Conservada) (310) y
- la subunidad grande de la ARN polimerasa II (312).

Los oligonucleótidos usados para su amplificación fueron diseñados por El Baidouri *et al.*, (2013) y las condiciones se describen aquí por primera vez (ver Tabla 17 y Tabla 19). En todos los casos, el protocolo de la mezcla de reacción y del programa de amplificación es igual, diferenciándose únicamente en los oligonucleótidos utilizados en cada PCR. En Tabla 17, figuran las 7 parejas de oligonucleótidos (el nombre es el asignado para esta Tesis Doctoral), la secuencia y el tamaño del amplicón esperado en pares de bases (pb).

Tabla 17. Componentes de la reacción de PCR de los genes multilocus de *L. infantum*.

Componentes	Composición [C]	Vol. de reacción (50 µl)
Tampón de reacción 10X (Biotools®)	750 mM Tris HCl pH 9.0, 500 mM KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM, 20 mM de MgCl ₂	5 µl
dNTPs (Biotools®)	10 mM	1 µl
Oligonucleótido sentido (Sigma®)	15µM	1 µl
Oligonucleótido anti sentido (Sigma®)	15µM	1 µl
Tth ADN polimerasa (Biotools®)	1 U/µl	1.4 µl
ADN	10 ng/µl	5 µl
Agua destilada estéril	-	36.5 µl

Tabla 18. Secuencias de oligonucleótidos empleados en la amplificación de los fragmentos de los 7 genes que componen el sistema *MLSA*.

Gen	Nombre Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)
<i>Factor de Iniciación de la elongación (Subunidad alfa) (030)</i>	030-F	AGT CCC GAA ACT GTG GAC TA	678
	030-R	GAC GGA GAG GTG GAT CTG AG	
<i>Espermina sintasa (040)</i>	040-F	CAG GCC CTG GTC TTC TGC	711
	040-R	GTG CAT GTC GCT GCT GTA AT	
<i>Proteína tipo deshidrogenasa ligante de zinc (100)</i>	100-F	GAG AAG CCA GCC TTG AAG TG	636
	100-R	GAA GAC GTA GTG CAC CGA CA	
<i>Factor de Iniciación de traducción (subunidad alfa) (120)</i>	120-F	AGA GGA TGG ACG TCC CAA G	714
	120-R	CAG AAG GAG CCG TGT GAA A	
<i>Nucleósido hidrolasa (140)</i>	140-F	GAA CCA GGG AAT GGA GAA CA	642
	140-R	TTC CAA GAA GCG AGC GTT AT	
<i>Proteína hipotética (Conservada) (310)</i>	310-F	ATG AGG CGT CTC CTT CAC AA	810
	310-R	CGG CGT TCT TGA GTG CTT	
<i>Subunidad grande de la ARN polimerasa II (312)</i>	312-F	AAG TAC CAG CAG TCC CTC ATC	486
	312-R	GCA GCC GCA CAA TGC GCT	

^F Oligonucleótido en dirección sentido (5' → 3')^R Oligonucleótido en dirección antisentido (3' → 5')**Tabla 19.** Condiciones de amplificación de los siete genes *multilocus* a partir del ADN de *L. infantum*

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	1 min	35
Hibridación	54	1 min	
Elongación	72	1 min 30 seg	
Elongación final	72	10 min	1
Conservación	4	∞	-

5.2. Técnicas de caracterización molecular en flebotomos

5.2.1. Amplificación del gen que codifica para la Citocromo oxidasa subunidad 1.

Se amplificó una región de 650 pb del gen mitocondrial del citocromo oxidasa subunidad 1 (COI). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificar este segmento fueron: LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') y HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'). El protocolo empleado fue adaptado y modificado de Folmer *et al.*, (1994); Hebert *et al.*, (2003). Los componentes y condiciones de PCR se detallan en la Tabla 19 y Tabla 20, respectivamente.

Tabla 20. Componentes de la reacción de PCR para el gen mitocondrial *coi*.

Componentes	Composición [C]	Vol. de reacción (50 µl)
Tampón de reacción 10X (Biotools®)	750 mM Tris HCl pH 9.0, 500 mM KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM, 20 mM de MgCl ₂	5 µl
dNTPs (Biotools®)	10 mM	1 µl
Oligonucleótido LCO 1490 (Sigma®)	15µM	1 µl
Oligonucleótido HCO2198 (Sigma®)	15µM	1 µl
Tth ADN polimerasa (Biotools®)	1 U/µl	1.5 µl
ADN	10 ng/µl	5 µl
Agua destilada estéril	-	35.5 µl

Tabla 21. Condiciones de amplificación de la PCR del gen mitocondrial *coi*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	35
Hibridación	55	1 min	
Elongación	72	1 min	
Elongación final	72	10 min	1
Conservación	4	∞	-

5.2.2. Amplificación del gen que codifica para el Citocromo b

Se amplificó una región de aproximadamente 500 pb del gen mitocondrial citocromo B (*Cytb*). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de este segmento fueron: PhleF (5'-AAT AAA TTA GGA GGA GTA ATT GC) y PhleR (5'-GCC TCG AWT TCG WTT ATG ATA AAT T-3'). El protocolo utilizado está modificado de Latrofa *et al.*, (2012). El volumen final de cada reacción fue 25 µl, para la cual se usaron 2 µl de ADN tal y como se indica en la Tabla 22. Las condiciones de PCR están descritas en la Tabla 23. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9800Fast (Applied Biosystems®) habilitado con rampa estándar.

Tabla 22. Componentes de la reacción de PCR para el gen mitocondrial *cytb*.

Componentes	Composición [C]	Vol. de reacción (25 µl)
Tampón de reacción 10X (Biotools®)	750 mM Tris HCl pH 9.0, 500 mM KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ 200 mM, 20 mM de MgCl ₂	2,5 µl
dNTPs (Biotools®)	10 mM	0,7 µl
Oligonucleótido PhleF (Sigma®)	15µM	0,7 µl
Oligonucleótido PhleR (Sigma®)	15µM	0,7 µl
Tth ADN polimerasa (Biotools®)	1 U/µl	0,7 µl
ADN	10 ng/µl	2 µl
Agua destilada estéril	-	17,7 µl

Tabla 23. Condiciones de amplificación de la PCR del gen mitocondrial *cytb*

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	35
Hibridación	55	1 min	
Elongación	72	1 min	
Elongación final	72	10 min	1
Conservación	4	∞	-

5.2.2.1. Digestión de los productos de amplificación del *cytb*

Con el objetivo de identificar las especies de flebótomos según el método diseñado por Latrofa *et al.*, (2011), los productos amplificados en la PCR del *cytb* se someten a digestión con la enzima de restricción *AseI* (actividad endonucleasa). De acuerdo a las instrucciones del fabricante se usaron 17 µl de producto de PCR, con 1 µl de enzima y 2 µl del tampón de reacción 10X. La mezcla anterior fue incubada durante 4 - 12 h (overnight) a una temperatura de 37 °C, tal y como se resume en la Tabla 24.

En cuanto a la naturaleza de la endonucleasa, se trata de una enzima que proviene de una cepa de *E. coli* que lleva el gen *AseI* de *Aquaspirillum serpens* y cuya actividad restrictiva está dada en el sitio de 5'-AT^{TA}-AT-3'. (5000 U a 1 U/µl, New England Biolabs® Inc.). Los productos de la digestión fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con Pronasafe (CONDA®, Madrid, España) tal y como se indica a continuación.

Tabla 24. Componentes del tratamiento de digestión del ADN del *Cytb* con *AseI*.

Componentes	Volumen de reacción (20 µl)
Buffer 10X NEBuffer 3.1 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 µg/ml BSA, pH 7.9)	2 µl
Enzima <i>AseI</i>	1 µl
ADN-producto de PCR- <i>cytb</i>	17 µl

6. Detección y visualización de los productos de amplificación por PCR

6.1. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar el tamaño y cantidad relativa del ADN se emplea la técnica de electroforesis en geles de agarosa D-1 (CONDA®, Madrid, España). El porcentaje de agarosa (p/v) utilizado en los geles varió en función del tamaño de los fragmentos visualizados y la separación deseada para éstos. La concentración de agarosa osciló entre 1,5 y 2%, según la necesidad. Como tampón se utilizó TBE 1X (890 mM Tris, 890 mM Ácido bórico, 20 mM EDTA, pH 8). Para la visualización del ADN se añadió en la agarosa un agente intercalante del ADN, *PRONASAFE Nucleic Acid Staining solution* (20.000x) (CONDA®, Madrid, España) a una concentración de 4µl/100. Las muestras se prepararon mezclando el ADN (15 µl del producto de PCR) con 3 µl tampón de carga de alta densidad, compuesto por Sacarosa (20 g en 30 ml de H₂O), Orange G (0.1 g-%), xilenocianol FF (0.0312 g- 0,25%), y agua destilada estéril.

La separación electroforética se realizó en cubetas horizontales (Bio-Rad®, Hemel Hempstead, Reino Unido) aplicando una corriente eléctrica de 5 V/cm (75 mA) durante 60-90 minutos con una fuente de alimentación MBP3000E 3000 V Power Supply (IBI Scientific, Peosta, Estados Unidos) o PowerPac 300 (Biorad, Hercules, Estados Unidos). En cada gel se añade un indicador de peso molecular que permite estimar el tamaño de los fragmentos de ADN, comparando las distancias que éstos recorren en el gel. En esta tesis se empleó el marcador de peso molecular Ladder RTU (Ready-to-Use) de 100 pb (NIPPON Genetics Europe®, Dueren, Alemania), de 50µg / 500µl. Este marcador produce 12 fragmentos (en pares de bases): 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 3000. Además, proporciona la masa aproximada de ADN en cada banda (0,5 g de una carga) para la aproximación de la masa de ADN en muestras de intensidad comparable y de tamaño similar.

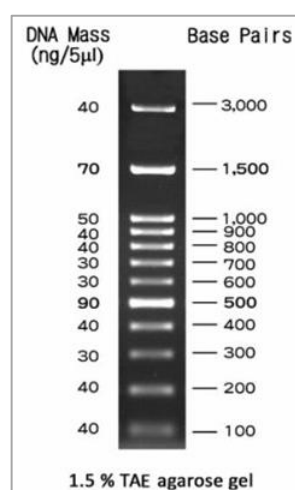


Figura 32. Marcador de peso molecular.

La visualización de las bandas se realizó bajo luz ultravioleta de longitud de onda de 340 nm a través de un transiluminador de la marca MiniBIS ProGel 16 mm *Imaging System* (DNR Bio-Imaging Systems®, Jerusalem, Israel), acoplado al sistema de captura de imágenes *GelCapture v.7.4* de la misma casa comercial. Las fotografías de los geles se realizaron en papel térmico Mitsubishi P95.

6.2. Electroforesis en chip o matriz fluorescente

La electroforesis de ADN en microchips se realizó con el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Este es un método rápido y fiable para determinar la calidad, integridad y concentración del ADN en tiempo real. Los chips contienen una serie de microcanales interconectados que se rellenan con una matriz fluorescente. El ADN se separa

mediante electroforesis en función de su tamaño y se visualiza por la emisión de fluorescencia. Los datos se muestran como un electroferograma de fluorescencia y también como una imagen similar a un gel. Para llevar a cabo las mediciones con esta técnica seguimos el protocolo del fabricante.

Tabla 25. Características del microchip de ADN1000 utilizado para la electroforesis capilar.

Parámetros de medida del tipo de chip usado en este estudio				
Tipo de chip	Rango de separación (nt)	Concentración DNA/RNA total requerida	Capacidad del chip (muestras)	Parámetros obtenidos
DNA 1000	25-100	0.5-50 ng/μl	12	Concentración y tamaño del amplicón

7. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para la obtención de los fragmentos específicos de ADN del gen *K26*, los geles de agarosa se visualizaron con la ayuda de un transiluminador de onda larga y de baja intensidad (302-365 nm) para no deteriorar el ADN (Ultrabright UV, MaestroGen®, Taiwan). Los productos de PCR se escindieron manualmente con un bisturí estéril y se transfirieron a tubos TER de 2 ml para la posterior recuperación del ADN.

Para la purificación del se utilizó el kit comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN®, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema de purificación, concentración y separación de sales, consiste en la utilización de una membrana de sílice diseñada para recuperar el ADN de diversas soluciones, eliminando los productos contaminantes como enzimas, oligonucleótidos y dNTPs. La membrana de sílice aumenta la unión específica de ADN en presencia de sales, y retiene el ADN durante los diferentes lavados con soluciones tampón, permitiendo la concentración de la muestra. El protocolo seguido fue el descrito por el fabricante, que consistió en añadir tres volúmenes de solución QG, facilitada por la casa comercial, a un volumen de agarosa. Tras mezclar y disolver el fragmento del gel a 50°C durante 10 min, se añadió la muestra a la columna y se centrifugó un minuto a 13.000 rpm, descartando este primer eluido. Para lavar, se añadieron 0.75 ml de la solución PE a la columna y se centrifugó de nuevo a 13.000 rpm durante un minuto. Para asegurarnos que el etanol presente en el tampón de lavado se elimina totalmente, se procedió a una nueva centrifugación. Finalmente, se colocó la columna en nuevo TER de 1.5 ml y se añadieron 30 μl de agua estéril en el centro de la membrana de la columna. Tras incubar durante un minuto a temperatura ambiente, se centrifugó la columna a 13.000 rpm durante un minuto, consiguiéndose así la recuperación del eluido con alta concentración de ADN.

8. Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR que se visualizaron como una única banda intensa en los geles de agarosa y con el tamaño esperado según la región amplificada, fueron incluidos en las placas y/o tubos para su posterior envío al servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del ISCIII. La secuenciación del ADN se realizó bidireccional (secuencias sentido y antisentido) utilizando los mismos cebadores que se utilizaron para la amplificación de las distintas regiones de interés expuestas en esta memoria. La muestra se sometió a una amplificación previa en un volumen final de 10 μ l, en la que se emplearon de 100 a 200 ng de ADN, un único oligonucleótido por reacción a una concentración de 3 pmoles/ μ l y 3 μ l de la mezcla de reacción del kit comercial *BigDye® Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit*, (Applied Biosystems®, Foster City, EEUU). La lectura de cada secuencia se realizó en un secuenciador automático de 96 capilares *ABI Prism® DNA Analyzer 3730XL* (Applied Biosystems®, Foster City, EEUU).

El método de secuenciación utilizado es el desarrollado por (Sanger & Coulson, 1975), el cual consiste en la incorporación de dideoxinucleótidos marcados fluorescentemente a una cadena de ADN durante el proceso de copiado de la misma. Los dideoxinucleótidos no poseen el grupo 3'-OH necesario para la formación del enlace fosfodiéster que permite la unión entre nucleótidos, por lo tanto, se interrumpe la elongación de la cadena cada vez que uno de estos es incorporado en ella. De este modo se generan secuencias de diferentes tamaños. Estas se hacen migrar a través de un gel de poliacrilamida donde se separan por tamaños. El equipo de secuenciación cuenta con un dispositivo que permite captar la emisión de luz de los cuatro dideoxinucleótidos. La lectura se hace entonces partiendo de las secuencias más cortas hasta la secuencia completa, y se genera un gráfico con picos de emisión de luz en la posición de cada uno de los nucleótidos de la secuencia de interés (cromatograma).

8.1. Revisión, edición y alineamiento de secuencias de ADN.

La edición de los cromatogramas es muy importante para detectar y, en su caso, paliar posibles errores en la lectura por parte del secuenciador de las bases nitrogenadas de la secuencia de ADN analizada. Por ello, con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), se revisaron de forma manual tanto las secuencias “sentido” como las “antisentido” antes de obtener la secuencia consenso entre ambas. Las zonas del principio y del final de cada secuencia suelen ser las que generan mayores dificultades de asignación de bases, mientras los picos al principio de la secuencia aparecen más anchos y superpuestos entre sí por saturación de la reacción, los picos del final de la secuencia van perdiendo altura y anchura, por debilitamiento de la señal, hasta que desaparecen. Por estos motivos, se secuencia en los dos sentidos porque de esta forma se puede realizar la lectura de más

nucleótidos, ya que zonas de picos “distorsionados” en una secuencia coincidirán con zonas “limpias” en la secuencia complementaria. Una vez que las secuencias sentido y antisentido para cada una de las muestras fueron revisadas y editadas, se generó la secuencia consenso correspondiente (*contig*) es decir, una secuencia con el mínimo posible de ambigüedades o errores (Löytynoja & Goldman, 2008). Una vez obtenidas las secuencias, y como paso previo a su alineamiento, se realizaron búsquedas con el algoritmo *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) para comprobar la identidad de las secuencias generadas, mediante la comparación de las secuencias nucleotídicas, empleando la base de datos no redundante de GenBank (Altschul *et al.*, 1990) Además, se identificaron y descargaron secuencias de referencia a través de la base de datos de Pubmed y su conexión a Genbank.

Las secuencias consenso pasaron a formar parte de la matriz a alinear. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó de forma manual con el programa *BioEdit Sequence Alignment* editor © v. 7.0.9 (Hall, 1999; Kumar & Filipski, 2007). En algunos casos, los alineamientos de varias secuencias para un gen se hicieron utilizando el algoritmo *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994), bajo los valores por defecto para la penalización y extensión de gaps. Este es un algoritmo de alineamiento múltiple de tipo progresivo. Con este tipo de algoritmos, se calcula en primer lugar las distancias entre todos los pares de secuencias que se pretende alinear y representándolas en un árbol guía y, a continuación, se genera un alineamiento entre las dos secuencias más cercanas y se van incorporando las demás en el orden que dicta el árbol guía (Hall, 2011). Posteriormente estas matrices son alineadas con secuencias de referencia y/o combinadas, según sea su análisis.

8.2. Análisis bioinformático de las secuencias de ADN

Con el propósito de caracterizar los genes de interés, las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas fueron estudiadas empleando diferentes herramientas computacionales. Estas herramientas permitieron realizar los análisis en las secuencias de ADN para obtener información sobre las poblaciones de *L. infantum* y *Phlebotomus spp.*

El paquete informático MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) se utilizó para visualizar y editar secuencias (Tamura *et al.*, 2013). El mismo permitió caracterizar algunos elementos de las secuencias nucleotídicas de los genes *coi*, *cytb* en las distintas especies de flebótomos, la estimación de la composición nucleotídica, el cálculo de las distancias genéticas empleando diversos algoritmos de los modelos de sustitución, entre otros parámetros del polimorfismo genético. Asimismo, MEGA se utilizó para construir los árboles filogenéticos basados en los métodos de distancias y carácter. Las distancias de las secuencias se estimaron

según los modelos de Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980) y el modelo de *p-distance* (Nei & Kumar, 2000). Los árboles se construyeron por los métodos de Unión al vecino (*Neighbor-Joining*), Máxima Parsimonia (*Maximum Parsimony*) y Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*) siguiendo los parámetros sugeridos por el manual de árboles filogenéticos (Hall, 2011). Otros de los programas usados para estimar las inferencias filogenéticas fueron el paquete de inferencia filogenética *PHYLIP* (Felsenstein, 1993) y la plataforma informática en línea *PhyML* v3.0 (*Maximum Likelihood Phylogenesis*) cuyo algoritmo permite estimar árboles de Máxima Verosimilitud que incluye parámetros bayesianos (aBayes). El programa *ALTER* (*Alignment Transformation Environment*) se utilizó para realizar los cambios de formato de FASTA a los formatos que fuesen necesarios (ej. *PHYLIP*) (Glez-Peña *et al.*, 2010). El programa *FigTree* se utilizó como visor gráfico y editor de árboles filogenéticos.

Con el fin de encontrar motivos repetitivos y de llevar a cabo la traducción de las secuencias nucleotídicas a secuencias aminoacídicas, se empleó el paquete informático (Hall, 1999). Con base en la información de las secuencias de ADN y a través del programa *DnaSP* v5 (*DNA Sequence Polymorphism*) (Librado & Rozas, 2009), se realizó el análisis polimórfico de las secuencias, se estimó el número de haplotipos, la diversidad haplotípica nucleotídica, el número total de mutaciones, los sitios segregantes (polimórficos), los sitios *singletons* y sitios informativos de parsimonia, entre otros.

Para la asignación de alelos y secuencias tipo se empleó el programa *MLSTest* (Tomasini *et al.*, 2013). Con el objetivo de investigar la estructura poblacional de *L. infantum* se utilizó el programa *STRUCTURE* v2.3.4 (Universidad de Chicago, Chicago, IL, USA), el cual utiliza un enfoque estadístico bayesiano y aplica un modelo método de agrupación para inferir la estructura de los individuos en los grupos sobre la base de los datos de genotipado multilocus (Pritchard *et al.*, 2000). Finalmente el programa *STRUCTURE HARVESTER* V0.6.92 genera los gráficos de los resultados obtenidos por el análisis en *STRUCTURE* (Earl & vonHoldt, 2012).

Para analizar la posible variabilidad entre las distintas especies de flebótomos del área Mediterránea se empleó la herramienta *NEBcutter* v.2.0, la cual estimó la presencia o ausencia del punto de corte de la enzima *Ase* I en las secuencias del gen *cytb-ndI*, además de realizar la digestión teórica y visualizar el patrón de restricción mediante una electroforesis “*in silico*”. En la Tabla 26 se relacionan los programas utilizados para el análisis de secuencias de ADN, indicándose su aplicación y la dirección electrónica donde están disponibles:

Tabla 26. Herramientas empleadas en los análisis bioinformáticos realizados en esta Tesis Doctoral.

Programa	Uso	Sitio web
<i>BLAST</i>	Búsqueda de identidad	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Bioedit</i>	<ul style="list-style-type: none"> Edición y alineamiento de secuencias Traducción de secuencias nucleotídicas a aminoácidos 	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html
<i>MEGA</i>	<ul style="list-style-type: none"> Edición de secuencias Alineamiento Selección de modelos de evolución Variabilidad molecular Inferencia filogenética 	http://www.megasoftware.net/
<i>ALTER</i>	Cambios de formatos de archivos.	https://sing.ei.uvigo.es/ALTER/
<i>CLUSTALX</i>	Alineamientos pareados y múltiples	http://www.clustal.org/clustal2/
<i>DNAstar</i>	Secuencias consenso	https://www.dnastar.com/
<i>PhyML</i>	Inferencia filogenética y Construcción de arboles	http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/versions.php
<i>PHYLIP</i>	Inferencia filogenética	http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html
<i>FIGTREE</i>	Visor gráfico de árboles filogenéticos.	http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/
<i>JModelTest</i>	Selección del modelo de evolución	http://www.molecularrevolution.org/software/phylogenetics/jmodeltest
<i>NEBcutter</i>	Aplicación in vitro de enzimas de restricción	http://nc2.neb.com/NEBcutter2/
<i>DnaSP</i>	<ul style="list-style-type: none"> Variabilidad genética Cálculo de diversidad haplotípica, sitios segregantes, número de haplotipos, contenido nucleotídico Test de Neutralidad 	http://www.ub.edu/dnasp/
<i>MLSTest</i>	Análisis de alelos y secuencias tipo	https://mlstest.codeplex.com/
<i>STRUCTURE</i>	Análisis bayesiano para inferir estructura de poblaciones	http://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html
<i>STRUCTURE HARVESTER</i>	Gráfico de la estructura de poblaciones	

Capítulo 1.

Tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* implicados en el brote de leishmaniasis en el suroeste de la Comunidad Autónoma de Madrid, España 2008-2012.

1. ANTECEDENTES

Leishmania infantum es el agente causal de la leishmaniasis cutánea y visceral en España, y los *Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi* son los responsables de su transmisión dependen el contexto de un ciclo zoonótico en el que el perro es el principal reservorio (Alvar *et al.*, 2012). Durante la última década ha llamado la atención la propagación y re-emergencia de la leishmaniasis en Europa, incluyendo la discusión sobre los factores que contribuyen a ello (Dujardin *et al.*, 2008; Ready, 2010). Ejemplos de esto son la propagación hacia el norte de Italia de la leishmaniasis humana y canina (Biglino *et al.*, 2010; Maroli *et al.*, 2008), y de la leishmaniasis canina hacia el norte de España (Miró *et al.*, 2012), o la transmisión endémica de *L. infantum* en perros en Hungría, un país que hasta hace poco había sido considerado libre de Leishmaniasis (Farkas *et al.*, 2011; Tánczos *et al.*, 2012).

A este escenario se suma el reciente brote urbano de leishmaniasis humana en el sur-oeste de la Comunidad Autónoma de Madrid, España (desde aquí en adelante se hará referencia a esta como Madrid) (BECM., 2012). Desde 1997 Madrid ha llevado a cabo la vigilancia de la leishmaniasis mediante un sistema de notificación de enfermedades de declaración obligatoria, con registros regulares de 12-25 casos por año (BECM., 2012). Sin embargo, en el último trimestre del año 2010 se reporta un marcado aumento en el número de casos, indicando las investigaciones posteriores que un brote había comenzado el 1 de julio de 2009 en la región sur-oeste. Este brote afectó a cuatro municipios próximos, con una población de medio millón de habitantes y que comparten amplias zonas verdes de sus parques urbanos, (BECM., 2012). Como fue reportado por Arce *et al.* (2013), hasta al 31 de diciembre de 2012 se reportaron un total de 466 casos de leishmaniasis asociados a este brote. De los 446 casos aproximadamente el 36% correspondió a formas viscerales y el 64% a formas cutáneas, la media de edad de los casos fue de 44 años (con un rango de 2 meses a 95 años), y tan sólo el 15% de ellos presentó alguna forma de inmunodepresión.

El Centro Colaborador de la OMS para leishmaniasis, en el Instituto de Salud Carlos III, y que actúa como laboratorio de referencia para leishmaniasis en España, contribuyó al diagnóstico de los casos asociados al brote y a la caracterización molecular de los aislados de *L. infantum* obtenidos durante la investigación del mismo. Los resultados de esta investigación se presentan en este capítulo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Primer grupo: Aislados de la zona del brote y otras áreas de Madrid, 2008–2012.

En el Centro Colaborador de la OMS para leishmaniasis (OMS-CCL), el diagnóstico de la leishmaniasis se realiza utilizando métodos moleculares, serológicos y parasitológicos, como el aislamiento por cultivo en medio NNN. Además, algunos hospitales españoles proporcionan aislados de *Leishmania* que son almacenados en el criobanco del OMS-CCL.

Desde el 1 de enero de 2008 hasta el 31 de julio 2012 se diagnosticaron un total de 475 casos de leishmaniasis en Madrid por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las muestras de los pacientes procedían de las 11 Áreas de Salud en las que la región está dividida. La media del número de casos para el período 2008-2010 fue de 42, mientras que 190 casos fueron diagnosticados en 2011 y 158 en el primer semestre de 2012; este alto incremento de casos estaba asociado al brote de leishmaniasis que presentaban las áreas de salud 9 y 10, en el sur-oeste de la región. De los 475 casos, 251 presentaban un cuadro de LC, 206 de LV y otras 18 correspondían con otras formas de leishmaniasis (leishmaniasis mucocutánea y linfadenopatía localizada). Los detalles de los casos de leishmaniasis diagnosticados por PCR y su distribución por año y área de salud se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. Detalles de la distribución por año, Área de Salud, y forma clínica de los casos de leishmaniasis procedentes de Madrid diagnosticados mediante PCR en el OMS-CCL, 1 de enero de 2008 a 31 de Julio de 2012 (n=475).

Área de Salud	Año					Total por área de salud	Formas clínicas		
	2008	2009	2010	2011	2012		LC	LV	Otras ^a
A1	2	4	0	0	0	6	0	6	0
A2	2	0	3	5	0	10	3	7	0
A3	0	0	1	2	0	3	0	3	0
A4	4	10	3	5	4	26	6	18	2
A5	20	8	13	11	6	58	13	45	0
A6	1	0	0	3	2	6	3	2	1
A7	1	3	1	2	2	9	1	3	5
A8	7	8	7	4	3	29	3	23	3
A9 ^b	5	2	16	141	126	290	211	73	6
A10 ^b	3	1	2	9	10	25	10	14	1
A11	0	0	0	8	5	13	1	12	0
Total	45	36	46	190	158	475	251	206	18

LC: Leishmaniasis cutánea, LV: Leishmaniasis visceral

^a "Otras" comprende la leishmaniasis mucocutánea (LMC), linfadenopatía localizada (LL) (A4: 2 LM en 2009; A6: 1 LM en 2008; A7: 2 LL en el período 2009-2011, y 3 LM en el período 2011-2012; A8: 1 LL en 2009 y LM 2 durante el período 2009-2012; A9: 5 LL en el período 2010-2012, y 1 LM en 2011; A10: 1 LL en 2012).

^b Las Áreas de Salud 9 y 10 fueron afectadas por el brote que comenzó en Julio de 2009.

Sobre la base de la distribución de los casos que se muestra en la Tabla 27 se preparó un grupo de aislados de *Leishmania* de los casos diagnosticados en Madrid en el período comprendido entre el 1 de enero de 2008 y el 31 de julio de 2012. Con el fin de tener una visión global del contexto en que se produjo el brote se incluyeron aislados representativos de las 11 áreas de Salud de Madrid. Por la misma razón también se decidió incluir aislados obtenidos en el año 2008 (un año antes del comienzo del brote).

En total se incluyeron 73 cepas de *L. infantum*, de 16 de pacientes con LC, 53 de pacientes con LV, 3 de los pacientes afectados por linfadenopatía localizada (LL), y 1 paciente con leishmaniasis mucocutánea (LM). Un total de 15 aislados provenían de pacientes con infección por VIH. La Tabla 28 muestra más detalles sobre los aislados incluidos en este primer grupo, en relación a con el año de aislamiento, Área de Salud de origen, forma clínica de la leishmaniasis, condición de VIH, edad y género.

Tabla 28. Tipado molecular de los aislados de *L. infantum* incluidos en el Grupo 1. Madrid, 1 enero de 2008 a 31 julio de 2012 (Grupo 1, n=73).

Código OMS del aislado ^a	Año ^b	Área ^c	Forma Clínica	VIH	Edad	Tipo ITS ^d	k26 ^d (pb)	Genotipo combinado ^{d,e}
MHOM/ES/2008/LLM-1665	2008	1	LV	NEG	>18	LOMBARDI	962	L-962
MHOM/ES/2008/LLM-1695	2008	1	LV	NEG	>18	LOMBARDI	836	L-836
MHOM/ES/2008/LLM-1643	2008	5	LV	POS	>18	A	794	A-794
MHOM/ES/2008/LLM-1657	2008	5	LV	POS	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2008/LLM-1676	2008	5	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2008/LLM-1667	2008	5	LV	POS	>18	A	584	A-584
MHOM/ES/2008/LLM-1644	2008	8	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2008/LLM-1646	2008	8	LC	POS	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2008/LLM-1653	2008	8	LV	POS	>18	A	584	A-584
MHOM/ES/2008/LLM-1681	2008	8	LV	POS	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2008/LLM-1648	2008	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2009/LLM-1707	2009	1	LV	POS	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2009/LLM-1725	2009	1	LV	NEG	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2009/LLM-1734	2009	1	LV	NEG	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2009/LLM-1750	2009	1	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2009/LLM-1729	2009	4	LC	NEG	>18	A	794	A-794
MHOM/ES/2009/LLM-1756	2009	4	LV	POS	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2009/LLM-1790	2009	5	LC	POS	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2009/LLM-1703	2009	8	LV	POS	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2009/LLM-1712	2009	8	LV	NEG	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2009/LLM-1714	2009	8	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2009/LLM-1896	2010	1	LV	NEG	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2010/LLM-1920	2010	2	LV	NEG	<5	LOMBARDI	962	L-962
MHOM/ES/2010/LLM-1873	2010	4	LV	NEG	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2010/LLM-1858	2010	5	LV	NEG	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2010/LLM-1859	2010	8	LV	NEG	<5	LOMBARDI	962/920	L-962/920
MHOM/ES/2010/LLM-1888	2010	8	LV	NEG	<5	LOMBARDI	962	L-962
MHOM/ES/2010/LLM-1854	2010	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2010/LLM-1918	2010	9	LL	NEG	>18	LOMBARDI	962	L-962
MHOM/ES/2010/LLM-1886	2010	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2010/LLM-1899	2010	9	LV	POS	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-2027	2011	1	LV	NEG	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2011/LLM-2032	2011	1	LV	NEG	>18	LOMBARDI	962/920	L-962/920
MHOM/ES/2011/LLM-2005	2011	3	LV	NEG	<5	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-2051	2011	4	LV	NEG	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2011/LLM-1948	2011	5	LC	NEG	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2011/LLM-2033	2011	5	LV	NEG	<5	A	626	A-626
MHOM/ES/2011/LLM-2047	2011	5	LV	POS	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2011/LLM-1946	2011	7	LL	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-2018	2011	8	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-2037	2011	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-1988	2011	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	962	L-962
MHOM/ES/2011/LLM-1964	2011	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	836	L-836

LC: leishmaniasis cutánea; LV: leishmaniasis visceral; LMC: leishmaniasis mucocutánea; LL: linfadenopatía localizada; VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana; ITS: Espaciadores transcritos internos (ribosomales); *haspb*: (sinónimo de *k26*) gen de la proteína de superficie B hidrófila y acilada; NEG: negativo; POS: positivo; OMS: Organización Mundial de la Salud.

^a Los aislados fueron ordenados por año de aislamiento y Área de Salud.

^b Corresponde al año en el que se aisló la cepa.

^c Áreas de Salud 9 y 10 se vieron afectadas por el brote que se inició el 1 de julio de 2009.

^d Resultado de los métodos de tipado molecular, los cuales son explicados más adelante en el capítulo.

^e La combinación de genotipos se deriva de la combinación de los resultados de tipo de secuencia ITS y tamaño del producto de reacción en cadena de polimerasa de *haspb* (*K26*).

Tabla 28. Continuación. Tipado molecular de los aislados de *L. infantum* incluidos en el Grupo 1. Madrid, 1 enero de 2008 a 31 julio de 2012 (Grupo 1, n=73).

Código OMS del aislado ^a	Año ^b	Área ^c	Forma Clínica	VIH	Edad	Tipo ITS ^d	k26 (pb) ^d	Genotipo combinado ^{d,e}
MHOM/ES/2011/LLM-1929	2011	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-1956	2011	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-1974	2011	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-1982	2011	9	LL	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-1983	2011	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-1984	2011	9	LV	POS	>18	LOMBARDI	962/920	L-962/920
MHOM/ES/2011/LLM-1998	2011	9	LM	NEG	>18	LOMBARDI	962/920	L-962/920
MHOM/ES/2011/LLM-2001	2011	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-2039	2011	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	962/920	L-962/920
MHOM/ES/2011/LLM-2046	2011	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-2048	2011	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2011/LLM-1937	2011	10	LV	NEG	>18	LOMBARDI	962/920	L-962/920
MHOM/ES/2011/LLM-1954	2011	10	LV	NEG	>18	LOMBARDI	962	L-962
MHOM/ES/2011/LLM-2025	2011	11	LV	NEG	5-18	LOMBARDI	962/920	L-962/920
MHOM/ES/2012/LLM-2096	2012	1	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2134	2012	1	LV	POS	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2098	2012	5	LV	NEG	<5	A	626	A-626
MHOM/ES/2012/LLM-2118	2012	6	LC	NEG	>18	A	626	A-626
MHOM/ES/2012/LLM-2109	2012	6	LV	NEG	>18	LOMBARDI	962	L-962
MHOM/ES/2012/LLM-2139	2012	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2059	2012	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2063	2012	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2064	2012	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2072	2012	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2074	2012	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2076	2012	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2077	2012	9	LC	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2079	2012	9	LV	POS	>18	LOMBARDI	920	L-920
MHOM/ES/2012/LLM-2097	2012	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	962/920	L-962/920
MHOM/ES/2012/LLM-2113	2012	9	LV	NEG	>18	LOMBARDI	920	L-920

LC: leishmaniasis cutánea; LV: leishmaniasis visceral; LMC: leishmaniasis mucocutánea; LL: linfadenopatía localizada; VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana; ITS: Espaciadores transcritos internos (ribosomales); *haspb*: (sinónimo de *k26*) gen de la proteína de superficie B hidrófila y acilada; NEG: negativo; POS: positivo; OMS: Organización Mundial de la Salud.

^a Los aislados fueron ordenados por año de aislamiento y Área de Salud.

^b Corresponde al año en el que se aisló la cepa.

^c Áreas de Salud 9 y 10 se vieron afectadas por el brote que se inició el 1 de julio de 2009.

^d Resultado de los métodos de tipado molecular, los cuales son explicados más adelante en el capítulo.

^e La combinación de genotipos se deriva de la combinación de los resultados de tipo de secuencia ITS y tamaño del producto de reacción en cadena de polimerasa de *haspb* (K26).

2.2. Segundo grupo: aislados de *L. infantum* zimodemas MON-1 y MON-24, aislados entre 1988-2005.

Siendo los zimodemas MON-1 y MON-24 los principales responsables de los casos de LC y LV en España (Chicharro *et al.*, 2003), decidimos incluir un segundo grupo de 83 aislados de *L. infantum* provenientes de Madrid, que habían sido previamente tipados mediante MLEE en el OMS-CCL como MON-1 (n=55) y MON-24 (n=28). De este modo también tendríamos en nuestro análisis una referencia a nivel de zimodema. Los detalles de este segundo grupo de aislados se presentan en la Tabla 29 y Figura 36.

Tabla 29. Listado de las cepas de *L. infantum* MON-1 y MON-24 incluidas en el Grupo 2, Madrid, España, 1988-2005 (Grupo 2, n=83).

Código OMS del aislado ^a	Año ^b	Área ^c	Forma Clínica	VIH	Edad	Zimodema	Tipo ITS ^d
MHOM/ES/1988/LLM-180	1988	1	LV	NEG	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1990/LLM-195	1990	1	LV	n. d	n. d	MON-1	A
MHOM/ES/1991/LLM-326	1991	4	LV	POS	n. d	MON-1	A
MHOM/ES/1991/LLM-328	1991	4	LV	NEG	n. d	MON-1	A
MHOM/ES/1992/LLM-339	1992	1	LV	n.d	n. d	MON-1	A
MHOM/ES/1992/LLM-335	1992	1	LV	POS	n. d	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/1992/LLM-315	1992	4	LV	n.d	n.d	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/1992/LLM-323	1992	5	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1992/LLM-306	1992	5	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/1993/LLM-404	1993	5	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/1994/LLM-410	1994	5	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1995/LLM-442	1995	2	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1995/LLM-468	1995	3	LV	n.d	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/1995/LLM-450	1995	4	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/1995/LLM-464	1995	5	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1995/LLM-470	1995	5	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1995/LLM-482	1995	5	LV	NEG	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1996/LLM-554	1996	4	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/1996/LLM-549	1996	5	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1996/LLM-556	1996	5	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1996/LLM-548	1996	5	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/1997/LLM-607	1997	4	LC	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1997/LLM-465	1997	5	LV	POS	>18	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/1997/LLM-616	1997	5	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1997/LLM-623	1997	5	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/1997/LLM-674	1997	5	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1997/LLM-666	1997	5	LC	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/1997/LLM-665	1997	9	LV	POS	5-18	MON-1	A
MHOM/ES/1997/LLM-690	1997	11	LV	POS	>18	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/1998/LLM-739	1998	3	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1999/LLM-755	1998	5	LV	POS	n.d	MON-1	A

LC: leishmaniasis cutánea; VL: leishmaniasis visceral; VIH: virus de inmunodeficiencia humana; ITS: Espaciadores transcritos internos (ribosomales); *haspb*: (sinónimo de *k26*) gen de la proteína de superficie B hidrófila y acilada; NEG: negativo; POS: positivo; OMS: Organización Mundial de la Salud.

^a Los aislados fueron ordenados por año de aislamiento, Área de Salud y zimodema.

^b Corresponde al año en el que se aisló la cepa.

^c Áreas de Salud de la Comunidad de Madrid (1-11)

^d Resultado de los métodos de tipado molecular, los cuales son explicados más adelante en el capítulo.

Tabla 29. Continuación. Listado de las cepas de *L. infantum* MON-1 y MON-24 incluidas en el Grupo 2, Madrid, España, 1988-2005 (Grupo 2, n=83).

Código OMS del aislado ^a	Año*	Área ^b	Clínica ^a	VIH	Edad*	Zimodema	Tipo ITS ^d
MHOM/ES/1998/LLM-789	1998	8	LV	NEG	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1999/LLM-896	1999	5	LV	POS	n.d	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/1999/LLM-883	1999	8	LC	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/1999/LLM-826	1999	11	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/2000/LLM-936	2000	4	LV	n.d	n.d	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/2001/LLM-983	2001	5	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/2001/LLM-980	2001	8	LV	NEG	>18	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/2001/LLM-984	2001	8	LV	NEG	>18	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/2002/LLM-1220	2002	1	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/2002/LLM-1181	2002	1	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/2002/LLM-1166	2002	5	LV	POS	>18	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/2003/LLM-1262	2003	1	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/2003/LLM-1304	2003	1	LV	NEG	>18	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/2003/LLM-1327	2003	5	LV	NEG	<5	MON-1	A
MHOM/ES/2003/LLM-1258	2003	8	LV	NEG	>18	MON-1	LOMBARDI
MHOM/ES/2004/LLM-1372	2004	1	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/2004/LLM-1377	2004	1	LV	POS	>18	MON-1	A
MHOM/ES/2004/LLM-1337	2004	5	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/2004/LLM-1461	2004	5	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/2004/LLM-1405	2004	5	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/2004/LLM-1347	2004	10	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/2005/LLM-1524	2005	1	LV	n.d	>18	MON-1	A
MHOM/ES/2005/LLM-1523	2005	1	LV	n.d	>18	MON-1	A
MHOM/ES/2005/LLM-1492	2005	8	LV	POS	n.d	MON-1	A
MHOM/ES/1995/LLM-443	1995	4	LV	POS	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1995/LLM-441	1995	5	LV	POS	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1995/LLM-485	1995	5	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1995/LLM-465	1995	5	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1995/LLM-456	1995	8	LV	NEG	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1996/LLM-587	1996	2	LC	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1996/LLM-576	1996	5	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1996/LLM-598	1996	5	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1996/LLM-569	1996	11	LV	POS	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1997/LLM-713	1997	2	LC	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1997/LLM-711	1997	11	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1998/LLM-779	1998	8	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1998/LLM-730	1998	11	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/1999/LLM-845	1999	8	LV	POS	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2000/LLM-957	2000	5	LV	n.d	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2001/LLM-1078	2001	1	LV	POS	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2001/LLM-1065	2001	5	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2001/LLM-1027	2001	8	LV	POS	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2001/LLM-1032	2001	8	LV	POS	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2001/LLM-982	2001	1	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2002/LLM-1177	2002	8	LC	NEG	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2003/LLM-1305	2003	5	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2004/LLM-1346	2004	3	LV	POS	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2004/LLM-1367	2004	8	LV	POS	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2005/LLM-1475	2005	5	LC	NEG	< 5	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2005/LLM-1526	2005	1	LV	n.d	n.d	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2005/LLM-1478	2005	8	LV	NEG	>18	MON-24	LOMBARDI
MHOM/ES/2005/LLM-1525	2005	10	LV	NEG	n.d	MON-24	LOMBARDI

2.3. Extracción de ADN

Las cepas de *L. infantum* seleccionadas para este estudio estaban crioconservadas en el criobanco del OMS-CCL, para el tipado molecular de las mismas se extrajo el ADN a partir de pellets de cultivo utilizando el kit QIAamp® DNA mini (QIAGEN®), tal y como se describe en el Apartado 4.1 de Materiales y Métodos. El ADN se eluyó en agua destilada estéril con calidad para PCR y se ajustó a una concentración final de 10 ng/μl usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop® Technologies) como se señaló en el Apartado 4.1.1 de Materiales y Métodos. Cinco μl de cada muestra de ADN se utilizaron para las reacciones posteriores de PCR.

2.4. Tipado molecular

Se seleccionaron dos dianas diferentes del genoma de *Leishmania* para los análisis de tipado molecular. Se amplificaron tanto las regiones ITS1 e ITS2 siguiendo el protocolo descrito por Kuhls *et al.* (2005) e indicado en el Apartado 5.1.2 de Materiales y Métodos. El protocolo para la amplificación del gen *haspb* (*k26*) fue el diseñado por Haralambous *et al.* (2008) con algunas modificaciones como se describe en el Apartado 5.1.3 de Materiales y Métodos. Para la identificación de especies en los aislados del primer conjunto, se amplificó el gen que codifica para la proteína de choque térmico 70 (*hsp70*) como se describe por Fraga *et al.* (2010); la identificación de las especies no se llevó a cabo en el segundo conjunto, porque estos aislados se habían caracterizado previamente mediante la técnica de MLEE como *L. infantum* MON-1 o MON-24.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% usando bromuro de etidio para poder visualizarlos bajo luz ultravioleta. Para una precisa estimación del tamaño de los productos de PCR del gen K26, las bandas se escindieron de los geles de agarosa, y se purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN®), para posteriormente analizarlas mediante electroforesis capilar usando el kit de ADN Agilent 1000 en el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies®, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuenciación directa de los productos de PCR de las regiones ITS1, ITS2 y *hsp70* se realizó con los correspondientes oligonucleótidos sentido y antisentido; para la secuenciación del gen *hsp70* fue necesario también el uso de cebadores internos (Fraga *et al.*, 2010). Para la secuenciación se utilizó el kit Big-Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1 y el secuenciador automático ABI PRISM® 3730XL (Applied Biosystems®, Foster City, EE.UU). Las

secuencias obtenidas se editaron y ensamblaron usando el software *Bioedit* © v7.0.9 (T. Hall, 1999).

Las secuencias ITS1 e ITS2 se compararon con secuencias de los diferentes tipos de ITS descritos por Kuhls *et al.* (2005), el alineamiento de las secuencias se realizó con el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*® usando el algoritmo de alineación múltiple *ClustalW* con mínimos ajustes manuales. Los genotipos ITS fueron asignados a los aislados de acuerdo con el polimorfismo de las secuencias de las 12 regiones de microsatélites incluidas tanto en la región ITS1 (cuatro sitios) como en la ITS2 (ocho sitios). Los genotipos *k26* fueron asignados de acuerdo con el tamaño del producto de PCR, y se ajustaron teniendo en cuenta que la variabilidad en el tamaño del gen es debida al número nucleótidos (42) exhibidos como motivos repetidos (Bhattacharyya *et al.*, 2013; Depledge *et al.*, 2010; Haralambous *et al.*, 2008; Zackay *et al.*, 2013). Posteriormente se asignó a cada aislado un genotipo, derivado de la combinación de los resultados del tipo de secuencia ITS y el tamaño del producto de PCR de *K26* (Únicamente para el primer grupo de aislados).

Para el segundo grupo, se presentan únicamente datos de genotipos ITS; la información adicional del análisis del gen *k26* será objeto de estudio en el Capítulo 2.

2.5. Análisis Filogenético

El análisis filogenético basado en las secuencias de nucleótidos de las regiones ITS1 e ITS2 se realizó siguiendo el método de Máxima Parsimonia usando el paquete informático *PHYLP* (*PHYLogeny Inference Package*) versión 3.69 (Felsenstein, 1989). Para comprobar la robustez de las ramas internas, se realizaron 10.000 réplicas de bootstrap. Se incluyeron secuencias de ADN obtenidas del GenBank (AJ634341, AJ000288, AJ000294, AJ634356, AJ634367, AJ634373, AJ000297, AJ634376) que representaban cada uno de las secuencias tipo ITS, A-H, descritas por Kuhls *et al.* (2005). Las secuencias tipo ITS A y B corresponden a *L. infantum* de la Cuenca Mediterránea, China y Brasil, el tipo C corresponde a *L. donovani* de China, los tipos D, E y F están asociados a *L. donovani* en el este de África, el tipo G se asocia con *L. donovani* de Kenia e India, y el tipo H con *L. donovani* de la India (Kuhls *et al.*, 2005).

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de las regiones ITS 1 e ITS 2

El análisis de los 12 sitios de microsatélites de las secuencias concatenadas ITS1 e ITS2 mostró dos tipos diferentes de ITS entre los 73 aislados del primer grupo (aislados del área del brote de leishmaniasis y de otras regiones de Madrid, 2008-2012). El tipo de ITS-A estaba presente en 21 aislados, los 52 aislados restantes presentaban un tipo de ITS no descrito previamente (Kuhls *et al.*, 2005). Esta secuencia no descrita se sometió a una búsqueda en el GenBank usando el algoritmo *BLASTn* (Altschul *et al.*, 1990), encontrándose identidad con una secuencia de una cepa de *L. infantum*, MHOM/ES/87/Lombardi, No. de Acceso del GenBank AJ000295. Las 12 regiones microsatélites que se encuentran en MHOM/ES/87/Lombardi fueron idénticas a las observadas en nuestra secuencia problema (de aquí en adelante ITS-LOMBARDI). En la Figura 33, se muestra un alineamiento parcial de las secuencias ITS descritas por Kuhls *et al.* (2005), e incluyendo ITS-LOMBARDI, pudiéndose observar las diferencias entre los distintos tipos de secuencias. Las diferencias mostradas en esta figura se basan únicamente en el polimorfismo de las 12 regiones microsatélites.

Los 31 aislados procedentes de la región afectada por el brote presentaron el genotipo ITS-LOMBARDI (Áreas de Salud 9 y 10). La secuencia del gen *hsp70* de estos aislados fue comparada con la de otras cepas del complejo *L. donovani* disponibles en el Genbank (Nº de Acceso: FN395027-FN395033), pudiéndose comprobar que los aislados del brote eran *L. infantum*.

En el segundo grupo (*L. infantum* MON-1 y MON-24 aislados entre 1988 y 2005), 44 de los 55 aislados de *L. infantum* MON-1 presentaban el tipo ITS-A, mientras que los 11 aislados restantes el ITS-LOMBARDI. Todos los 28 aislados de *L. infantum* MON-24 fueron ITS-LOMBARDI.

En ambos grupos de aislados se encontraron los tipos de ITS, ITS-A e ITS-LOMBARDI en casos de LC y LV, y tanto en pacientes VIH positivos como negativos. Se observó que ambos tipos de ITS están ampliamente distribuidos en Madrid, y presentes en casi todas las Áreas de Salud, al menos desde 1988 el genotipo ITS-A y desde 1992 el genotipo ITS-LOMBARDI (ver Tabla 28, Tabla 29, Figura 35 y Figura 36). ITS-LOMBARDI es común a todos los aislados de *L. infantum* MON-24, pero no es específico de este zimodema, dado que 11 de los 55 aislados MON-1 también presentaban este mismo genotipo de ITS.

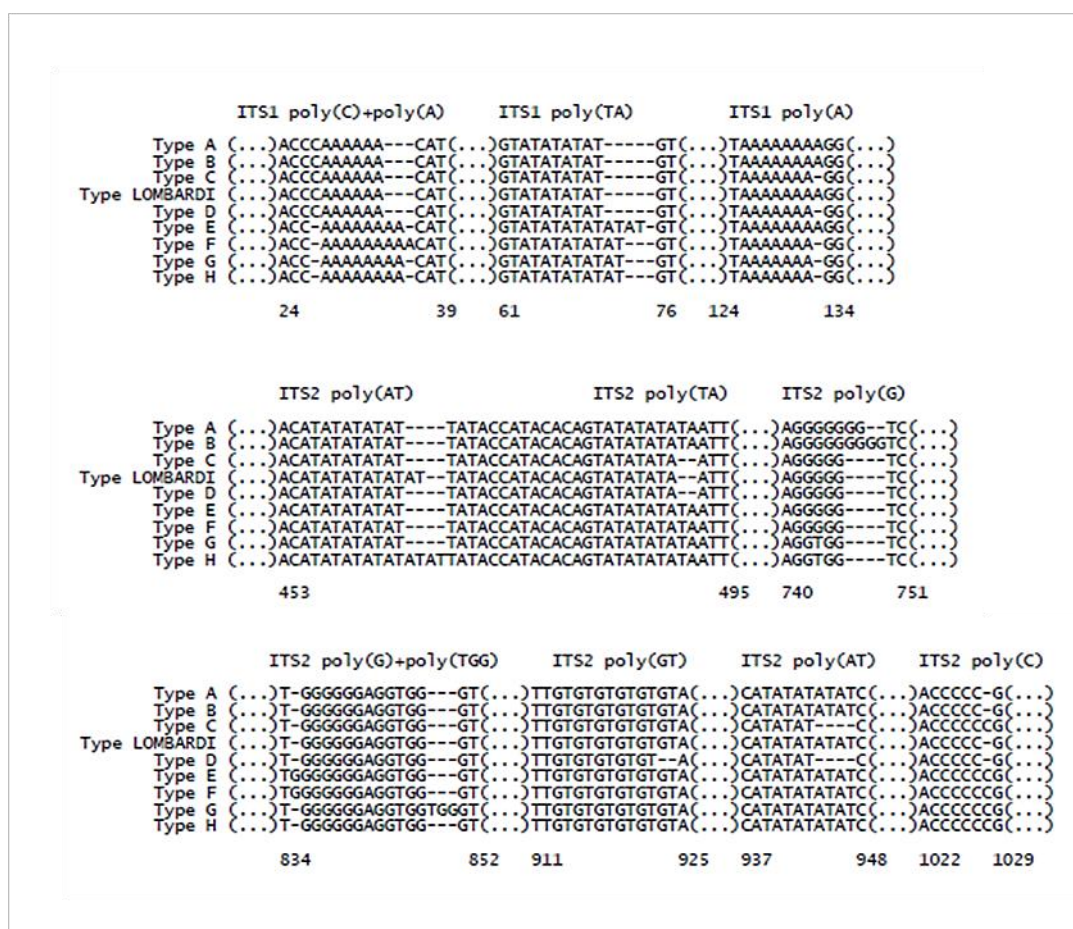


Figura 33. Alineamiento parcial de los ocho tipos de secuencias ITS descritas por Kuhls *et al.* (2005) para las cepas del complejo *Leishmania donovani* y del tipo de secuencia ITS LOMBARDI, identificada en 52 aislados de *L. infantum* en Madrid, 2008-2012.

3.2. Relaciones filogenéticas de las secuencias tipo ITS

El análisis filogenético resultante de los análisis de las secuencias ITS reveló que todas las secuencias A, B, C, D y LOMBARDI se agrupaban en un mismo *clado*, soportado por un valor de *bootstrap* del 87%. En este *clado* se observaban dos subgrupos, el primero de ellos agrupa las especies de *L. infantum* tipadas como ITS-A e ITS-B, separándolas del genotipo LOMBARDI que se encontró en un subsecuente grupo formado por cepas del complejo *L. donovani* de tipo ITS- C e ITS- D (Figura 34).

De los ocho tipos ITS descritos por Kuhls *et al.* (2005), los tipos A y B se han descrito en cepas de *L. infantum* aisladas en la cuenca mediterránea, China y Brasil; el tipo C en cepas de *L. donovani* de China; los tipos D, E y F en cepas de *L. donovani* de Etiopía y Sudán; el tipo G en cepas de *L. donovani* de India y Kenia y el H en cepas de *L. donovani* de la India. El tipo de secuencia ITS LOMBARDI, descrito aquí por primera vez, ha sido identificado en 52 aislados de *L. infantum* de Madrid, entre 2008 y 2012.

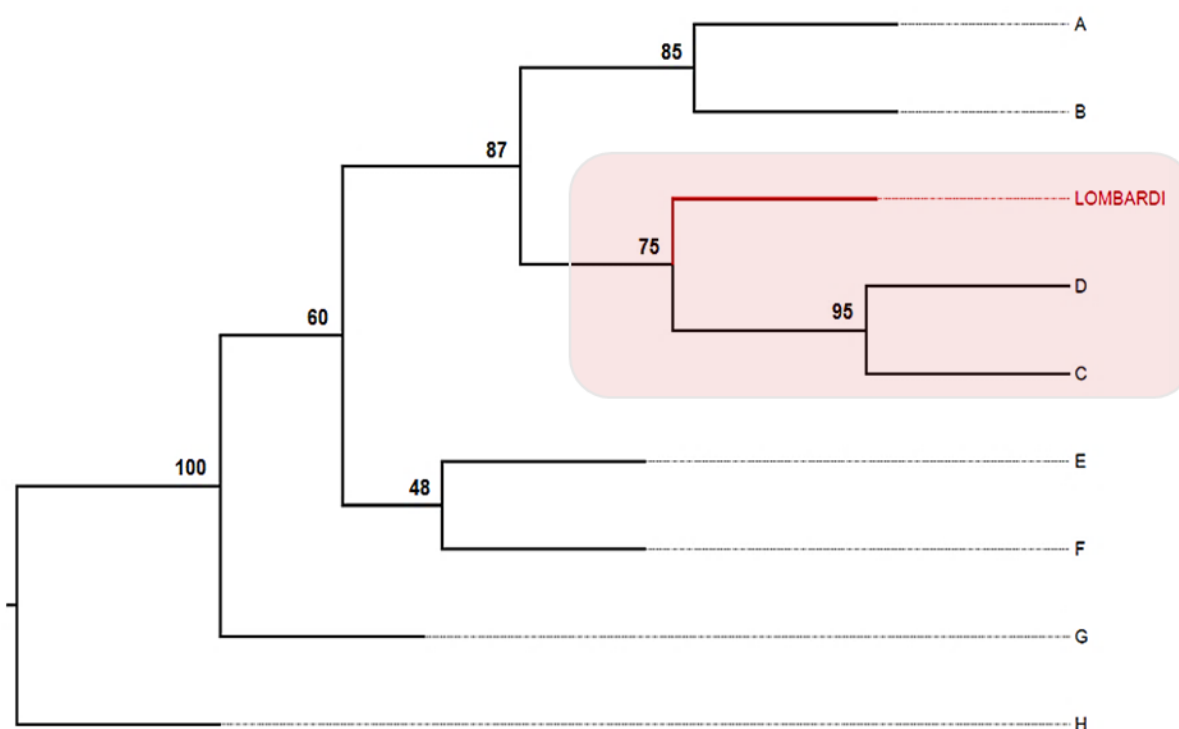


Figura 34. Se presenta el árbol más parsimonioso encontrado por búsqueda heurística, e inferido mediante el análisis de parsimonia de las secuencias de nucleótidos de ITS1 e ITS2. Los números por encima de las ramas indican (en porcentaje) el valor de *bootstrap* que apoya una rama determinada en 10.000 réplicas.

3.3. Genotipos combinados: ITS y k26

La electroforesis capilar de los productos de PCR del gen *k26* mostró 7 tamaños diferentes, desde 584 a 962 pb, para los 73 aislados del primer grupo que se estudiaron mediante este método. En la gran mayoría de los aislados de este grupo (65) se obtuvo un único producto de PCR, mientras que 8 aislados mostraron un producto doble, con tamaños de 920 y 962 pb. La combinación de los datos de genotipado de ITS y *k26* generó 8 genotipos combinados. El genotipo ITS-A se asoció a tamaños de *k26* de 584 a 794 pb, mientras que ITS-LOMBARDI se asoció con amplicones de mayor tamaño (836 a 962 pb).

Se identificaron 4 genotipos combinados entre los 32 aislados de las Áreas de Salud 9 y 10 (31 de los cuales estaban asociados al brote). Siendo el genotipo L-920 (ITS-LOMBARDI en combinación con un producto de PCR-*k26* de 920 pb) el más frecuente, presente en 23/32 aislados. En las otras Áreas de Salud (aquellas no afectadas por el brote), el genotipo combinado

más frecuente fue A-626 (presente en 17/41 aislados), seguido de L-920 (presente en 12/41 aislados).

No se observó una relación entre el genotipo combinado y la manifestación clínica de los casos de leishmaniasis, o a la coinfección con VIH. De los tres casos con linfadenopatía localizada (LL), dos presentaban el genotipo L-920 y uno el L-962. En el caso del paciente con leishmaniasis mucosa (LM), se identificó el genotipo L-962/920. Dos de los casos con LL y el caso con LM fueron aislados del Área de Salud 9 (Tabla 28).

Figura 35. Distribución de los genotipos combinados en el análisis de los aislados de *L. infantum* procedentes de Madrid, España, desde el 1 de enero de 2008 al 31 Julio de 2012 (Grupo 1). Los números 1-11 representan las 11 Áreas de Salud en Madrid.

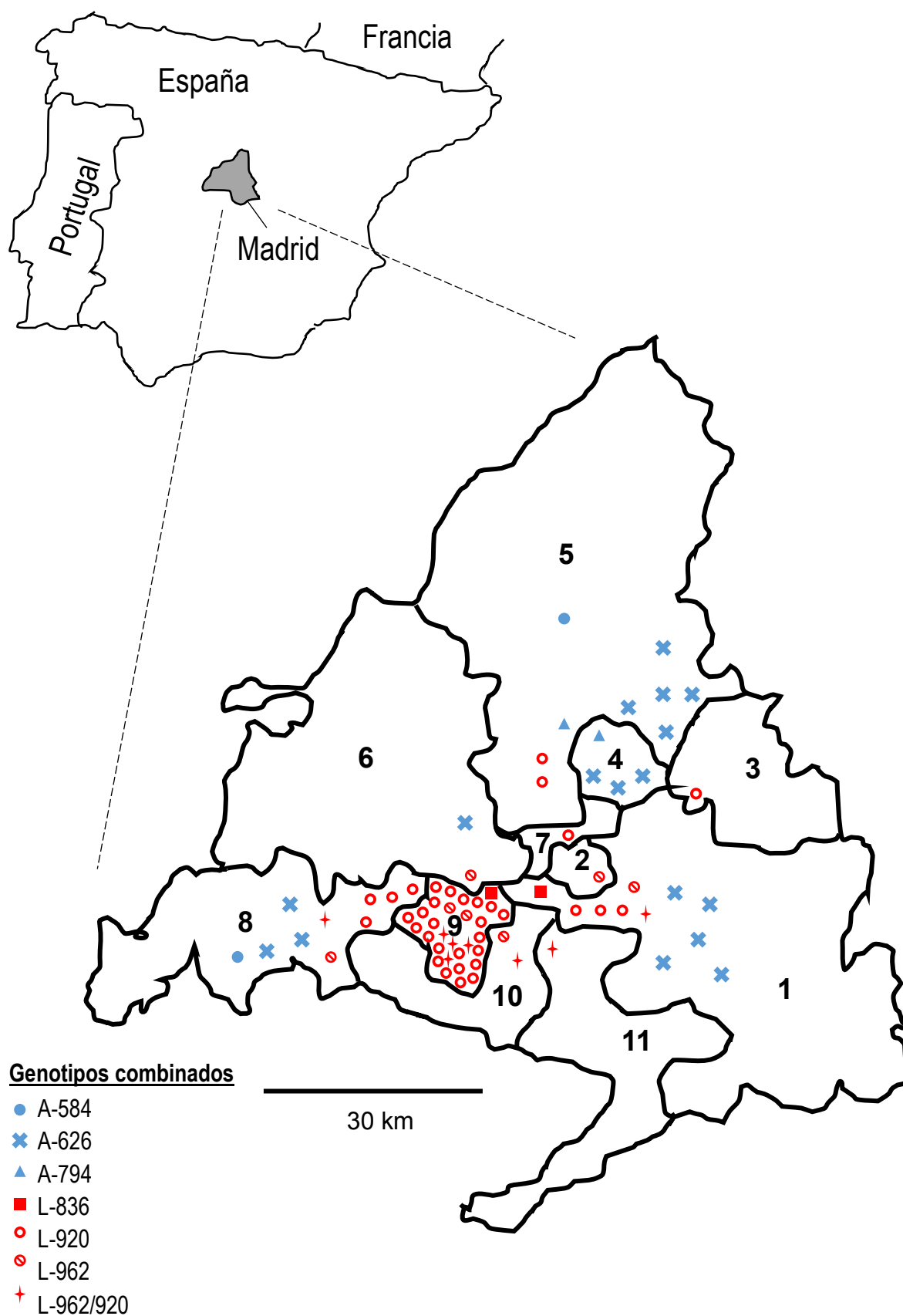
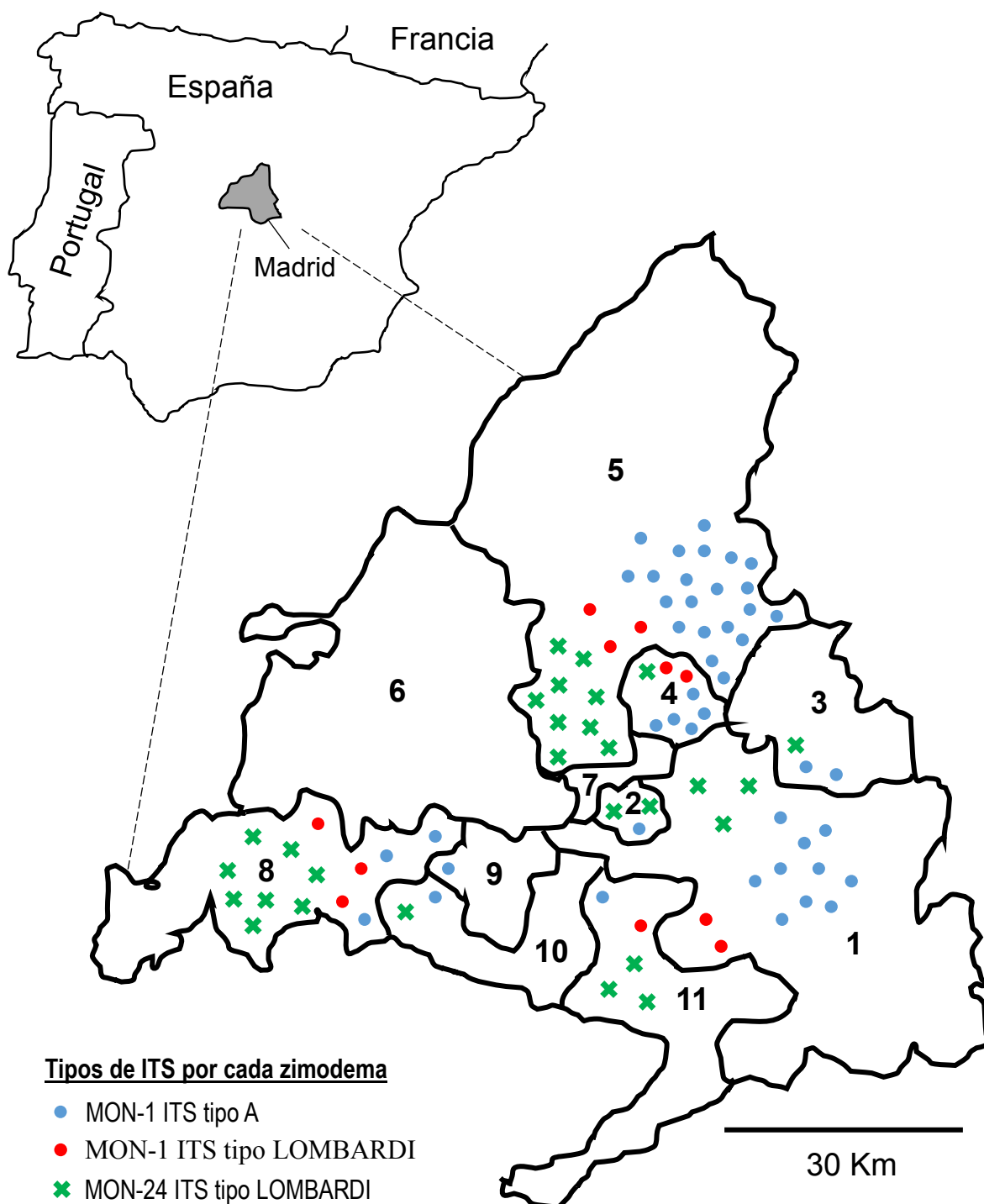


Figura 36. Distribución de los tipos de secuencias ITS para cada zimodema los aislados de *L. infantum* procedentes de Madrid, España, 1988-2005 (Grupo 2, n=83). Los números 1-11 representan las 11 Áreas de Salud en Madrid.



4. DISCUSIÓN

Este es el primer y más completo estudio de caracterización molecular de los aislados del brote de leishmaniasis urbana en Madrid, que comenzó en julio de 2009, realizado con aislados obtenidos en un corto periodo de tiempo (2008-2012) y en una pequeña área geográfica (Tabla 28). Además, también se proporciona información adicional sobre 83 cepas de *L. infantum* MON-1 y MON-24 aisladas de casos de Madrid entre 1988 y 2005.

En un estudio de tipado molecular anterior, que incluía cepas de *L. infantum* aisladas de Madrid y otras regiones de España entre 1986 y 1993, se reportaba únicamente la presencia de los tipos ITS A y B en *L. infantum* (Kuhls *et al.*, 2005). Sin embargo, en nuestro estudio el 71% de los aislados de *L. infantum* (52/73) del primer grupo presentaban el genotipo ITS-LOMBARDI, el cual no había sido previamente descrito. Este tipo de ITS también estuvo presente en todas las cepas de *L. infantum* MON-24 y en el 20% (11/55) de las MON-1 que se estudiaron en el segundo grupo. Desafortunadamente ni la cepa de *L. infantum* MON-24 MHOM/ES/87/Lombardi, aislada en España en 1987, ni ninguna otra MON-24 fue incluida en el estudio del análisis de las secuencias ITS del complejo de *L. donovani* realizado por (Kuhls *et al.*, 2005), a pesar de que autores del mismo grupo sometieron la secuencia de ITS de MHOM/ES/87/Lombardi al Genbank en 1998 (número de acceso AJ000295). Nuestro análisis filogenético, siguiendo un procedimiento similar al descrito por Kuhls *et al.* (2005), reveló que los aislados con genotipo ITS-LOMBARDI, a pesar de ser identificados como *L. infantum* (como se demostró por MLEE y por el análisis de secuencias de ADN del gen *hsp70*), no forman un grupo monofilético con los tipos ITS- A, B (característicos de la cuenca mediterránea, Brasil, China), ni tampoco está claramente asociado al segundo grupo, que contiene los genotipos ITS -C y -D, en los que se incluyen todas las cepas de África del Este y China, como se muestra en la Figura 34.

Sí que resulta evidente que el genotipo LOMBARDI ha estado circulando en España al menos desde 1987, a juzgar por la información que nos proporciona el código de la OMS de esta cepa (MHOM/ES/87/Lombardi).

De acuerdo con los datos presentados en este estudio, tanto en el primero como en el segundo grupo, el genotipo ITS-LOMBARDI es muy frecuente en las cepas de *L. infantum* de Madrid y ha estado presente en esta región, al menos, desde el año 1992 (Tabla 29). Los aislados de *L. infantum* obtenidos a través de xenodiagnóstico en liebres capturadas en un parque urbano en un estudio relacionado con el brote que se ha mencionado aquí, también se tiparon como ITS-LOMBARDI (Molina *et al.*, 2012), dicho genotipo ha sido el único observado en todos los casos humanos asociados al área del brote que han sido tipados hasta la fecha.

Otro estudio de caracterización molecular basado en el gen *k26*, en el que se analizaron cepas de *L. infantum* de España mostraba tamaños de aproximadamente 626, 870/980, 870/1200, y 870/1300 pb (Haralambous *et al.*, 2008). En nuestro estudio encontramos amplicones de *k26* de entre 584 y 962 pb, siendo los de 626 y 920 pb los más frecuentes, aunque entre los casos asociados al brote sólo se encontraron aislados con tamaños de *K26* de entre 836 a 962 pb (Tabla 28), siendo el más frecuente el de 920 pb.

El cuadro epidemiológico del brote de leishmaniasis que afecta a las Áreas de Salud 9 y 10 es consistente con una transmisión focal del parásito (BECM., 2012). Esto, junto con el hecho de que la mayoría de los aislados de *L. infantum* obtenidos de pacientes de estas áreas exhibía el genotipo combinado L-920, podría sugerir que el agente causal del brote es una cepa emergente, menos común o incluso “nueva” de *L. infantum*. Sin embargo, se debe tener cuidado antes de llegar a esta conclusión. Los estudios de vigilancia basados en la caracterización molecular de la leishmaniasis son escasos en Madrid y en España, y probablemente también en otros lugares. Por otra parte, el genotipo L-920 se ha aislado de otras cinco de las 11 Áreas de Salud de Madrid, y en dos de estas (Áreas de Salud 5 y 8) ha estado presente al menos desde el año 2008. Además, la secuencia tipo ITS- LOMBARDI ha sido descrita de una cepa de España obtenida en el año 1987, y en *L. infantum* MON-1 y MON-24 de Madrid desde el año 1992 y 1995, respectivamente, en diferentes Áreas de Salud (Tabla 29 y Figura 36). Por lo tanto, creemos que, en España, así como en otros países endémicos de leishmaniasis, se deberían llevar a cabo estudios más completos de vigilancia molecular. Teniendo en cuenta que la leishmaniasis está re-emergiendo y extendiéndose a áreas previamente no endémicas (WHO, 2010), las actividades dirigidas a acercar la investigación con la vigilancia, según lo sugerido por Dujardin *et al.* (2008), contribuirían a una mejor comprensión de la epidemiología de la leishmaniasis y por ende, permitirían el desarrollo de estrategias eficaces de control.

En términos de tipado molecular, se necesitan más estudios para determinar la magnitud y el origen del brote de Madrid, especialmente aquellos dirigidos a identificar los genotipos de parásitos que circulan entre los flebótomos, perros y otros reservorios alternativos. El OMS-CCL trabaja en este propósito y parte de estas investigaciones se presentan en los siguientes capítulos de esta memoria de tesis.

El simple análisis del tamaño del producto de PCR de *k26* indica que el brote no fue causado por una sola cepa del parásito (se encontraron cuatro genotipos combinados). Parece más probable que la causa del brote pudiera ser la propagación de un ciclo de transmisión bien establecido en una zona cercana, con su propio grado de variabilidad entre los parásitos, en una población con poca o ninguna inmunidad contra *Leishmania*.

A pesar de la extensa aplicación de los métodos moleculares en la evaluación de la estructura de poblaciones de *Leishmania* (Schönian *et al.*, 2008), en la realidad existen pocas oportunidades para validar marcadores moleculares en la investigación de brotes de leishmaniasis. Los resultados presentados contribuyen a mejorar esta validación. Tanto los resultados como el material biológico obtenidos en esta investigación permitirán abordar y validar otros enfoques de ayuda en epidemiología molecular como el análisis de secuencia de multilocus (*MLSA: Multilocus Sequencing Analysis*) o el tipado de microsatélites multilocus (*MLMT: Multilocus Microsatellite Typing*), aprovechando este "experimento de la naturaleza" que es el brote en de leishmaniasis del suroeste de Madrid.

Capítulo 2.

Caracterización molecular de cepas de *Leishmania infantum* aisladas de humanos, perros y flebótomos en España, 1986-2015

1. ANTECEDENTES

La leishmaniasis causada por *L. infantum* constituyen una de las principales zoonosis existentes en el Sur de Europa suponiendo un importante problema de salud pública (Dujardin *et al.*, 2008). En España está considerada como una enfermedad endémica, con mayor incidencia en el litoral mediterráneo y la meseta central (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012). No obstante, se está observando una expansión de la enfermedad hacia latitudes más septentrionales al igual que ocurre en el resto del continente europeo (Del Rio *et al.*, 2014; Gramiccia *et al.*, 2013; Miró *et al.*, 2012; Varani *et al.*, 2013).

Un ejemplo reciente del cambio en la epidemiología de la enfermedad, es el aumento de los casos de leishmaniasis humana en la zona urbana del Suroeste de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) como ya se ha mencionado en el Capítulo 1 (Arce *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2013). Con un aumento en la incidencia de de 2,44/100.000 habitantes en 2009 a 18,91/100.000 habitantes en 2015 y la participación de reservorios silvestres como el conejo y la liebre (Jiménez *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2012). Estas modificaciones en la epidemiología de *L. infantum* destacan la necesidad de una herramienta eficaz de tipado molecular que permita vigilar las poblaciones de parásitos que circulan actualmente y adaptar las medidas de control.

Tradicionalmente la caracterización de los aislados de *Leishmania* se ha realizado estudiando su perfil isoenzimático (MLEE) (Rioux *et al.*, 1990), que ha mostrado que la mayoría de los aislados de *L. infantum* pertenecen al zimodema MON-1, tanto en humanos como en perros. Aunque su frecuencia depende de las áreas de estudio: 96,7% en Portugal (Campino *et al.*, 2006); 88% en el sur de Francia (Pratlong *et al.*, 2004); más del 50% en Italia (Gramiccia, 2003); y hasta el 60% en España (Chicharro *et al.*, 2003; Jimenez *et al.*, 1995; Martín-Sánchez *et al.*, 2004). En individuos inmunocompetentes, el zimodema MON-1 alcanza a ser el responsable del 90% de los casos de LV y el 20% de las LC (Alvar *et al.*, 1997). Mientras que, en flebótomos este zimodema se ha detectado tan solo en el 18% de los aislados (Martín-Sánchez *et al.*, 2004).

Al ser MON-1 un zimodema extremadamente común, la técnica de MLEE no permite estudiar la variabilidad intraespecífica con el poder discriminatorio que permita realizar estudios epidemiológicos. Otros inconvenientes de esta técnica se han descrito en el apartado 4.1 de la Introducción. En este sentido, los métodos moleculares, por su mayor poder discriminatorio y rendimiento, suponen una interesante alternativa al MLEE para la caracterización de la variabilidad intraespecífica de *L. infantum* y su aplicación en la epidemiología de la enfermedad.

A pesar de la importancia de la leishmaniasis en el sur de Europa, las poblaciones circulantes de *L. infantum* han sido poco investigadas o los estudios realizados han usado un número de muestras poco representativo. Entre las herramientas empleadas por diversos autores se encuentran tanto

las regiones no codificantes del genoma de *Leishmania*, como genes codificantes de proteínas de superficie, ejemplo de estas dianas son los espaciadores intergénicos 1 y 2 (ITS1 e ITS2) y el gen *K26*, respectivamente.

Schönian *et al.*, (2001) y Kuhls *et al.*, (2005) han mostrado la utilidad del estudio de las regiones ITS1 e ITS2 para poner de manifiesto la variabilidad genética del complejo *L. donovani*. Kuhls *et al.*, (2005) describieron 8 genotipos o tipos ITS en el complejo *L. donovani*, basados en el polimorfismo de 12 regiones microsatélites ubicadas en las secuencias ITS1 e ITS2. En el Capítulo 1 mostramos la presencia de un genotipo adicional, responsable del brote de leishmaniasis de la CAM, hallazgo que nuestro grupo publicó en 2013 (Chicharro *et al.*, 2013).

En cuanto al gen *K26*, Haralambous *et al.*, (2008) demostraron que este también presenta un polimorfismo entre cepas del complejo *L. donovani*. El gen *k26* se caracteriza por poseer un dominio central repetitivo de 14 aminoácidos dispuestos en tándem, los cuales exhiben variación inter e intraespecífica tanto en su tamaño como en su composición (Depledge *et al.*, 2010; Haralambous *et al.*, 2008). En el Capítulo 1 hemos mostrado que este marcador molecular permitió discriminar 7 genotipos diferentes en 73 aislados clínicos de *L. infantum*.

Dado el poder resolutivo de las herramientas de genotipado anteriormente descritas y su utilidad en el estudio de la variabilidad intraespecífica de *L. infantum*, el objetivo del Capítulo 2 es proporcionar una visión más completa de la diversidad genética de *L. infantum* en España utilizando los marcadores moleculares ITS1, ITS2 y *k26*. Para ello se seleccionan 550 cepas aisladas entre 1986 y 2015 de humanos, perros y flebótomos, procedentes de 9 Comunidades Autónomas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Aislados de *L. infantum*

Los aislados de *L. infantum* utilizados en este estudio forman parte del criobanco del Centro Colaborador de la OMS para la leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid (CNM-ISCIII).

Todos los aislados de *L. infantum* fueron obtenidos a partir del cultivo en medio NNN (*Novy-McNeal-Nicolle*) siguiendo la metodología descrita en el Apartado 2.1 de Materiales y Métodos. Se estudiaron un total de 550 cepas de *L. infantum* procedentes de casos humanos (n= 475), perros (n=65) y flebótomos (n=10). Las cepas procedentes de humanos fueron aisladas como parte de las tareas de diagnóstico de rutina a partir de aspirados de médula ósea y sangre periférica (casos de LV) o biopsias cutáneas (casos de LC). Las cepas aisladas de perros provenían de estudios epidemiológicos y todas se obtuvieron a partir de aspirados de médula ósea. Los aislados del

vector fueron cedidos gentilmente por la Unidad de Entomología Médica del CNM-ISCIH y se obtuvieron a partir de *P. perniciosus* recolectados durante el trabajo entomológico de campo realizado durante la temporada de transmisión del 2012 en la zona del brote de leishmaniasis humana en Madrid. La información detallada sobre los datos epidemiológicos, clínicos y demográficos relacionados con las 550 cepas analizadas se encuentra en los Anexos 1, 2 y 3. El panel de aislados seleccionado incluye cepas representativas de diferentes Comunidades Autónomas: Andalucía, Islas Baleares, Castilla-La Mancha, Castilla y León, Cataluña, Extremadura, Galicia, Madrid y Comunidad Valenciana, obtenidas durante el período 1986–2015. Además, el 63% (344/540) de las cepas se habían caracterizado previamente en nuestro laboratorio mediante MLEE. La Tabla 30 resume las principales características de las 550 cepas de *L. infantum* consideradas en este estudio, incluyendo información geográfica, clínica y epidemiológica relevante en cada hospedador.

2.2. Extracción de ADN genómico a partir de muestras de cultivo

La extracción del ADN de los parásitos crioconservados en nitrógeno líquido se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en el Apartado 4.1 de Materiales y Métodos. Una vez extraído, el ADN genómico se conservó a -20°C para su posterior análisis molecular. La concentración y calidad del ADN obtenido se cuantificó por triplicado usando el quipo NanoDrop® *Spectrophotometer* ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, EE.UU) como se indicó en el Apartado 4.1.1 de Materiales y Métodos. Finalmente, el producto de la extracción se diluyó con agua destilada estéril para obtener una concentración final de 10 ng/μl.

Tabla 30. Principales características de los 550 aislados de *L. infantum* usados en este estudio, se muestran también los resultados para los genotipos ITS y K26.

Origen ^a	Hospedador	No. de cepas	Período de aislamiento (años) ^b	Zimodemas ^c		Formas Clínicas			VIH			Genotipado	
				MON-1	No MON-1	LV	LC	Otras	POS	NEG	n. d	Tipo de ITS	K26-ST ^d Tamaño de amplicón (bp)
Andalucía (n= 38)	Humano	33	1992-2005	6	27	32	1	-	29	3	1	ITS-A (24) ITS-LOMBARDI (9)	626 (5), 794 (2), 836 (4), 878 (4), 920 (3), 962 (12), 836/626 (1), 962/878 (1) ≥1100 (1), 626 (5)
	Perro	5	2001-2002	5	-	-	-	LCan	n.a	n.a	n.a	ITS-A (5)	626 (5)
Castilla -La Mancha (n= 11)	Humano	11	1987-2004	4	7	11	-	-	7	4	-	ITS-A (5) ITS-LOMBARDI (6)	626 (4), 920 (3), 962 (3), 962/878 (1)
Castilla y León (n=3)	Humano	3	1992-1995	2	1	3	-	-	1	1	1	ITS-A (2) ITS-LOMBARDI (1)	626 (2), 962 (1)
Cataluña (n= 26)	Humano	26	1991-2005	18	2	26	-	-	19	6	1	ITS-A (25) ITS-LISA (1)	542 (1), 626 (20), 836 (1), 920 (1), 962 (1), 920/626 (1)
	Perro	5	2001-2002	4	1	-	-	LCan	n.a	n.a	n.a	ITS-A (5)	626 (5)
Extremadura (n= 5)	Humano	5	1996-2003	1	4	5	-	-	3	2	-	ITS-A (3) ITS-LOMBARDI (2)	626 (1), 878 (2), 920 (1), ≥1100 (1)
Galicia (n=2)	Humano	2	1997-2000	-	2	2	-	-	2	-	-	ITS-A (1) ITS-LOMBARDI (1)	626 (1), 962 (1)
Islas Baleares (n= 44)	Human	44	1991-2004	30	14	39	5	-	29	7	8	ITS-A (42) ITS-LOMBARDI (2)	626 (27), 836 (3), 920 (3), 962 (5), 626/584 (4), 920/626 (1), 920/878 (1)
	Perro	1	2001	1	-	-	-	LCan	n.a	n.a	n.a	ITS-A (1)	626 (1)
Comunidad de Madrid (n= 329)	Humano	329	1986-2013	63	85	251	71	7	155	99	75	ITS-A (115) ITS-B (2) ITS-LOMBARDI (206) ITS-LISA (6)	584 (3), 626 (95), 794 (2), 836 (5), 878 (7), 920 (132), 962 (62), ≥1100 (1), 920/878 (4), 962/878 (3), 962/920 (10), ≥1100/962 (3), N.A (2)
	Perro	47	2001-2010	27								ITS-A (47)	626 (47)
	Flebótomo	10	2012	n.d	n.d	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	ITS-LOMBARDI (10)	920 (10)
Comunidad Valenciana (n= 22)	Humano		1991-2005	8	14	18	4	-	12	8	2	ITS-A (15) ITS-B (1) ITS-LISA (6)	626 (8), 878 (1), 920 (7), 962 (2), ≥1100 (3), ≥1100/962
	Perro	7	2001-2002	4	2	-	-	LCan	n.a	n.a	n.a	ITS-A (7)	626 (7)

LV, leishmaniasis visceral; LC, leishmaniasis cutánea; Otras: 5 casos de leishmaniasis ganglionar y 2 casos de leishmaniasis mucocutánea; N.A = no amplifica; n.d = datos no disponibles; n.a = no aplica

^a Origen geográfico agrupado por Comunidades Autónomas

^b Mayoría de los años del período representados

^c Cepas previamente tipadas mediante MLEE; No MON-1 cepas tipadas como otros zimodemas diferentes a MON-1

^d Genotipos derivados del tamaño del amplicón K26, llamados Secuencias Tipo (ST-K26).

2.3. Amplificación por PCR de las regiones ITS y el gen *k26*

Los análisis moleculares se llevaron a cabo por genotipado utilizando tres tipos de dianas moleculares: el espaciador transcrito interno (ITS) 1 y 2 del ADN ribosómico y el gen *K26*.

ITS1 e ITS2: La región ITS1 (300 pb) se amplificó específicamente utilizando 15 µM de cada uno de los oligonucleótidos LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') y L58S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'). De forma similar, la región ITS2 (700 pb) se amplificó usando la pareja de oligonucleótidos L5.8SR (5'-AAGTGCGATAAGTGGTA-3') y LITSV (5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3') (Kuhls *et al.*, 2005). Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo los protocolos que se describen en el Apartado 5.1.2 de Materiales y Métodos.

K26: La amplificación de la región K26 se realizó utilizando el protocolo diseñado por Haralambous *et al.* (2008) con algunas modificaciones de acuerdo al protocolo descrito en el Apartado 5.1.3 de Materiales y Métodos. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 µl utilizando 5µl de ADN (10 ng/ul) con 15 µM de cada oligonucleótido K26F (5'-ACGAAGGACTCCGCAAAG-3') y K26R (5'-TTCCCATCGTTTTGCTG-3').

El análisis electroforético de los productos amplificados se llevó a cabo en geles horizontales de agarosa al 1.5% p/v (CONDA®, Madrid), teñidos con *PRONASAFE* (CONDA, Madrid, España) y visualizados bajo luz UV como se describe en el Apartado 3.7.1 de Materiales y Métodos. El marcador de peso molecular utilizado fue Ladder RTU (Ready-to-Use) de 100 pb (NIPPON Genetics Europe, Dueren, Alemania), que abarca un rango de tamaños desde 100 a 3000 pb. Además, el tamaño de los productos de PCR-K26 se confirmó mediante una electroforesis capilar usando chips de ADN en el equipo *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, CA, EE.UU) siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 4.1.1 de Materiales y Métodos.

2.4. Purificación de los productos de PCR- K26

De las 550 cepas estudiadas, se seleccionaron 215 productos de PCR-K26 para su purificación. Dichos productos se escindieron de los geles de agarosa y se purificaron usando el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Hilden, Alemania) según las recomendaciones del fabricante (Apartado 7 de Materiales y Métodos).

2.5. Secuenciación de ADN

La secuenciación directa de los productos de PCR ITS1 e ITS2 y los productos purificados de K26, se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del ISCIII, utilizando el equipo “ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, EEUU) y el kit “Big Dye Terminator Cycle Sequencing V3.1 Ready Reaction Kit” (Life Technologies, Carlsbad, CA” (Applied Biosystems, EEUU). En todos los casos se secuenciaron las dos hebras de ADN. La secuenciación de ADN se realizó con los mismos oligonucleótidos que la reacción de amplificación. Los electroferogramas obtenidos se analizaron y editaron manualmente usando el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). A partir de las secuencias consenso generadas se realizaron los alineamientos múltiples para cada marcador molecular empleando el programa BioEdit v7.0.9 (T. Hall, 1999).

2.6. Análisis filogenético de las regiones ITS

Los genotipos ITS fueron asignados en cada cepa de acuerdo al polimorfismo de la secuencia de las 12 regiones de microsatélites que contiene la ITS1 (4 regiones) y la ITS2 (8 regiones). El análisis filogenético se realizó utilizando el método de Máxima Parsimonia (MP) estimado con la ayuda del programa PHYLIP (*Phylogeny Inference Package*), versión 3.69 (Felsenstein, 1993). Para evaluar la robustez de los nodos en el árbol filogenético resultante, se realizaron 10.000 repeticiones de *bootstrap* utilizando la opción de búsqueda heurística y los grupos de retención compatibles con el árbol consenso de la mayoría del 50%. Para realizar la construcción filogenética se incluyeron 9 secuencias ITS de referencia obtenidas desde el GenBank, y los tipos ITS de diferentes áreas geográficas hasta ahora descritos, incluyendo el genotipo ITS-LOMBARDI como se describió previamente en el capítulo1 (AJ634341, AJ000288, AJ000294, AJ634356, AJ634367, AJ634373, AJ000297, AJ634376 y AJ000295).

2.7. Análisis del polimorfismo del gen K26 y asignación de genotipos ST-K26

Los genotipos K26 o secuencias tipo (ST-K26) se derivan del tamaño del producto de PCR obtenido, teniendo en cuenta que la variabilidad del gen es debida al número de motivos repetidos de 42 nucleótidos (14 aminoácidos) (Figura 31). Finalmente, se generó un genotipo combinado vinculando los resultados del tipo de secuencia ITS y el tamaño del producto o ST-K26 para cada una de las cepas.

Con el fin de describir la variabilidad de la proteína antigénica K26 en *L. infantum*, las secuencias de nucleótidos de los fragmentos k26 se tradujeron conceptualmente en secuencias de aminoácidos utilizando la herramienta *Bioedit Translate* que contiene el paquete informático Bioedit v.7.0.9 (T. Hall, 1999). La composición de péptidos que componen los dominios repetitivos del gen que codifica el antígeno K26 ha sido utilizada para el análisis del polimorfismo de esta región (véase Figura 31). Además, se incluyeron secuencias de referencia recopiladas del GenBank para los análisis de la composición y orden de la proteína (EF504255 y EF504256).

De la combinación entre el tamaño correspondiente al tipo de secuencia K26 (ST) y la composición de la secuencia aminoacídica, a los aislados se les asignó un grupo siguiendo el modelo descrito en la organización de las regiones de repetición HASPB del complejo de *L. donovani* (Zackay *et al.*, 2013).

3. RESULTADOS

3.1. Actualización de la distribución de los genotipos ITS de *L. infantum* en España

El análisis de las 12 regiones microsatélites que contienen las secuencias ITS1 e ITS2 reveló una mayor variabilidad intraespecífica dentro de *L. infantum* que la descrita anteriormente en el Capítulo 1 y en estudios moleculares similares realizados en la región mediterránea.

Nuestros resultados ponen de manifiesto un nuevo genotipo no descrito hasta el momento, al que se le identificó como ITS-LISA. Esta nueva variante de *L. infantum* presenta diferencias con los genotipos ITS-A e ITS-B en una posición, la región microsatélite poly G, mientras que presenta si se le compara con ITS-LOMBARDI se observan 3 microsatélites diferentes: *poly AT*, *poly TA* y *poly G*, todas ellas incluidas en la región ITS2 (Figura 37).

		ITS2 poly(AT)	ITS2 poly(TA)	ITS2 poly(G)
INF	Type A	(...)ACATATATATAT----TATACCATACACAGTATATATAATT	(...)AGGGGGGG--TC(...)	
	Type B	(...)ACATATATATAT----TATACCATACACAGTATATATAATT	(...)AGGGGGGGGGTC(...)	
	Type C	(...)ACATATATATAT----TATACCATACACAGTATATATA--ATT	(...)AGGGGG----TC(...)	
	Type LOMBARDI	(...)ACATATATATATAT--TATACCATACACAGTATATATA--ATT	(...)AGGGGG----TC(...)	
DON	Type LISA	(...)ACATATATATAT----TATACCATACACAGTATATATAATT	(...)AGGGGGGGGG--TC(...)	
	Type D	(...)ACATATATATAT----TATACCATACACAGTATATATA--ATT	(...)AGGGGG----TC(...)	
	Type E	(...)ACATATATATAT----TATACCATACACAGTATATATAATT	(...)AGGGGG----TC(...)	
	Type F	(...)ACATATATATAT----TATACCATACACAGTATATATAATT	(...)AGGGGG----TC(...)	
	Type G	(...)ACATATATATAT----TATACCATACACAGTATATATAATT	(...)AGGTGG----TC(...)	
	Type H	(...)ACATATATATATATTATACCATACACAGTATATATAATT	(...)AGGTGG----TC(...)	
		453	495 740	751

Figura 37. Alineamiento parcial de las secuencias ITS2. Solo se muestran las tres posiciones diferentes respecto a las secuencias que aparecen en España (ITS-A, ITS-B e ITS-LOMBARDI). En rojo se señalan los polimorfismos en los microsatélites destacados para la secuencia ITS-LISA.

En resumen, cuatro diferentes tipos de ITS se identificaron en este estudio, incluyendo el nuevo tipo de ITS-LISA con una frecuencia de 2,7% (13/475). De las restantes cepas analizadas, el 49% (232/475) fueron identificadas como genotipo ITS-A (conocido como responsable de la mayoría de los casos clínicos en la Cuenca Mediterránea) y el 48% (227/475) como ITS-LOMBARDI, un genotipo inicialmente aislado en 1987 y formalmente descrito por nuestro grupo de investigación en 2013 (Chicharro *et al.*, 2013). Finalmente, menos del 1% (3/475) de las cepas estudiadas presentaban el genotipo ITS-B.

Se observó un claro patrón de distribución geográfica en los genotipos ITS de *L. infantum* y se comprobó que los genotipos ITS-A e ITS-LOMBARDI se encuentran distribuidos ampliamente por todo el país desde 1987 y 1991, respectivamente. Sin embargo, el genotipo ITS-LOMBARDI rara vez ha circulado en las regiones del Este de España, donde sólo se observaron dos aislados (0,4%) en las Islas Baleares. Por el contrario, los aislados pertenecientes al nuevo genotipo ITS-LISA estuvieron predominantemente presentes en la Comunidad Valenciana y Cataluña al menos desde 1986, mientras que el genotipo ITS-B tan solo aparece esporádicamente, 2 casos en Madrid en 1991 y 2007 y 1 caso en Valencia en 1995 (Figura 38).

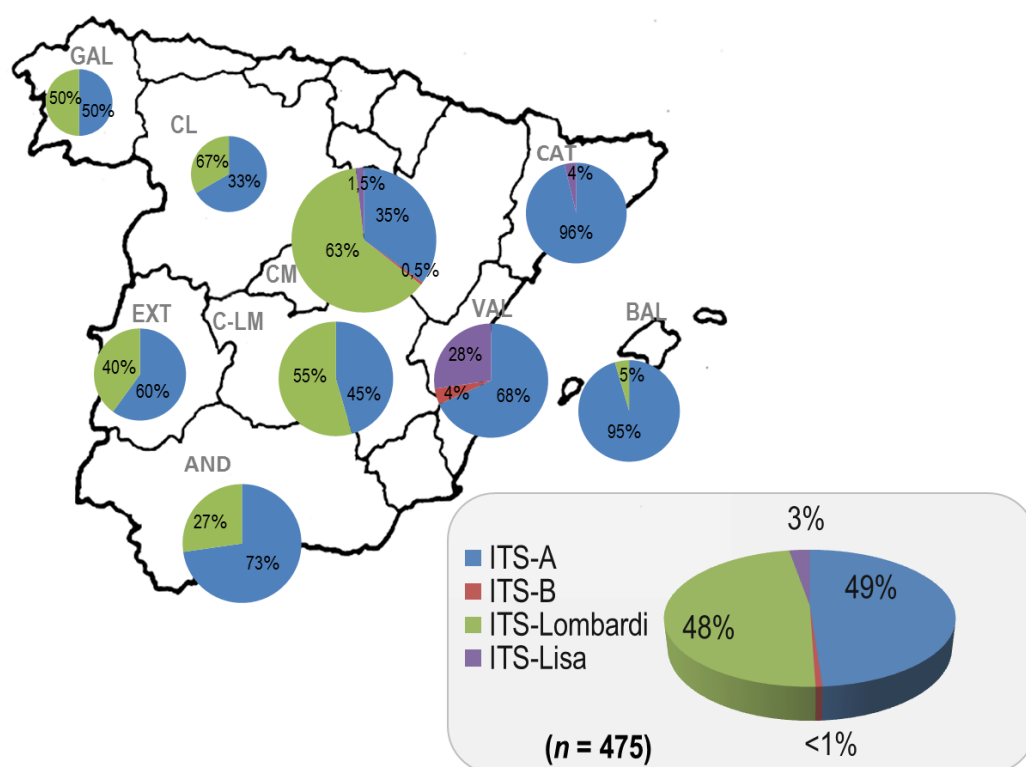


Figura 38. Distribución geográfica de los genotipos ITS de *L. infantum* procedentes de aislados clínicos de casos humanos seleccionados por Comunidades Autónomas ($n = 475$). Los gráficos individuales indican la proporción de las cepas en cada región incluida en el análisis. Las abreviaturas para las Comunidades Autónomas son las siguientes: GAL: Galicia, CL: Castilla y León, EXT: Extremadura, C-LM: Castilla La Mancha, AND: Andalucía, BAL: Islas Baleares.

La gran mayoría eran casos de LV (82%; 387), seguido de los casos de LC (17%; 81) y menos frecuentes en la muestra analizada fueron las formas ganglionares y los casos de LMC (2% 7). No se observó correlación aparente entre el genotipo de ITS y la manifestación clínica. Sin embargo, en las cepas de la Comunidad de Madrid (2008-2013) se pudo observar (estando las formas cutáneas y viscerales en similar proporción) que el subtipo ITS-A estuvo presente en la mayoría (57%) de los casos de LV, mientras que en los casos de LC el subtipo ITS-LOMBARDI fue el genotipo más prevalente (79%).

Con relación a los aislados de origen canino (n = 65), todas las secuencias ITS se correspondían con el genotipo ITS-A, mientras que los diez aislados de flebótomos pertenecían al genotipo ITS-LOMBARDI (Figura 39). Este mismo genotipo fue encontrado como el responsable de la mayoría (80%) de los casos humanos de la Comunidad de Madrid entre 2008–2013 (Anexos 1, 2 y 3).

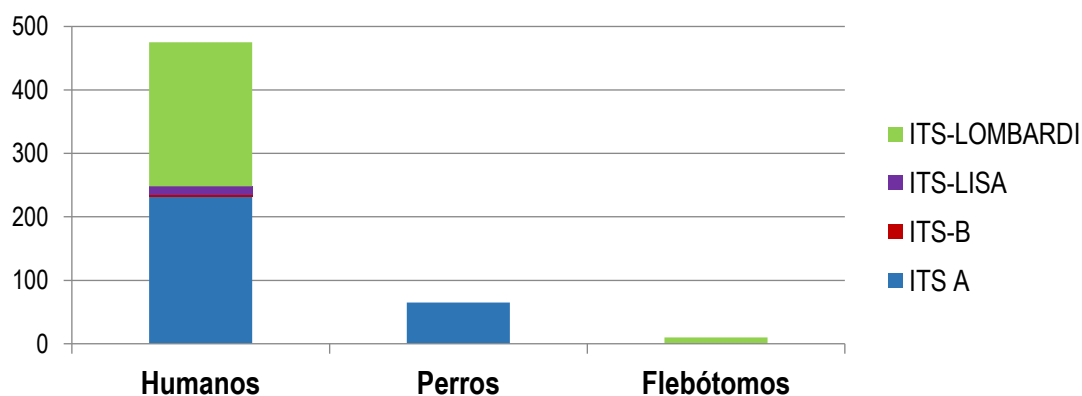


Figura 39. Diversidad y frecuencia de los genotipos ITS de *L. infantum* en aislados procedentes de casos humanos, de perros y flebótomos en España, 1986–2015.

3.2. Análisis filogenético de los genotipos ITS

La Figura 40 muestra las relaciones filogenéticas entre las secuencias ITS encontradas en *L. infantum* utilizando el método de Máxima Parsimonia. Se emplearon nueve secuencias de referencia de los genotipos C, D, E, F, G, H y LOMBARDI del complejo *L. donovani*. Los tipos ITS- A, B han sido descritos previamente en las cepas de *L. infantum* aisladas en la uenca mediterránea, China y Brasil; Tipo C en cepas de *L. donovani* de China; tipos D, E y F en cepas de *L. donovani* de Etiopía y Sudán; el tipo G en cepas de *L. donovani* de India y Kenia, y finalmente el tipo H en cepas de *L. donovani* de la India.

3.3. Caracterización genotípica del gen *k26* y su variabilidad aminoacídica.

Basado en el polimorfismo de la región que codifica el gen *k26*, se identificaron nueve genotipos diferentes (llamados aquí Secuencias Tipo, ST) en el panel de cepas procedentes de casos en humanos ($n = 475$). Los tamaños de los amplicones obtenidos oscilaron entre 542 y 1.300 pb. De ellos, el 93% (442/475) correspondía a perfiles que mostraban una sola banda en el gel; mientras que en el 7% restante (31/475) se observaron productos de PCR de doble banda. Los tamaños de los productos de PCR para todas las cepas examinadas se exponen en la Tabla 34. Entre los perfiles de banda única, se identificaron nueve STs diferentes, las más relevantes por número de aislados fueron: ST-626 ($n = 163$), ST-920 ($n = 151$), ST-962 ($n = 87$), ST-878 ($n = 15$) y ST-836 ($n = 12$) (véase la Tabla 34).

De acuerdo a la distribución geográfica mostrada por este marcador molecular, el genotipo ST-626 está ampliamente distribuido y ha sido identificado en las nueve regiones estudiadas, seguido de ST-962 (8/9 regiones) y ST-920 (7/9 regiones). Curiosamente, el producto de PCR doble ST-626/584 se encontró exclusivamente en las Islas Baleares.

En cuanto a los aislados de origen canino ($n = 65$), todos fueron asignados a una única variante ST-626 (Anexo 2); mientras que todos los aislados procedentes de *P. perniciosus* pertenecían al genotipo ST-920 (Anexo 3). Así mismo, los resultados del análisis de las secuencias K26 de los casos humanos sucedidos en Madrid durante el período 2008-2013 muestran que 85/137 (62%) casos poseen el mismo genotipo ST-920 (Anexo 1).

Un resumen histórico de la distribución anual y frecuencia de los genotipos ST-K26 en las cepas obtenidas de los casos humanos (1986-2013) se presenta en la Figura 41, con la presencia de los genotipos ST-626 y ST-920 en la mayoría de los últimos 27 años, mostrando la superioridad del primero de estos hasta el año 2005. Sin embargo, durante los años 2010 y 2013 la tendencia cambió, mostrando el predominio de ST-920, debido principalmente al aumento abrupto de casos humanos en las diferentes localidades de Madrid, cuya caracterización molecular mostro mayoritariamente el genotipo ST-920 (62%).

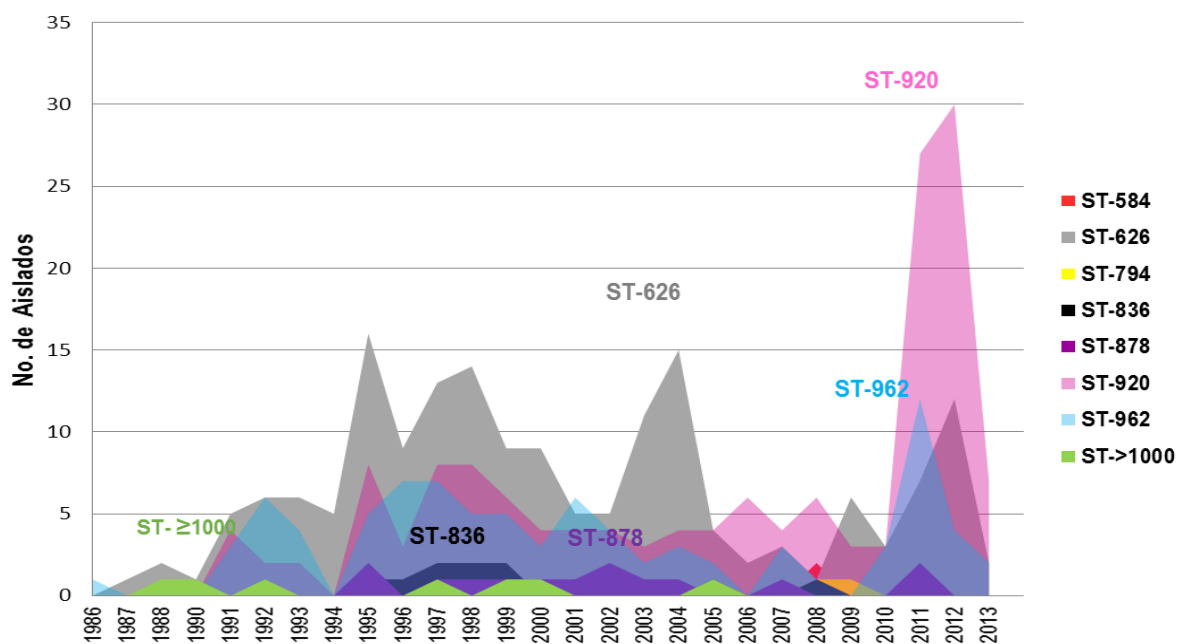


Figura 41. Secuencias tipo K26 (ST) identificadas en aislados clínicos españoles de *L. infantum* STs-k26 durante el período 1986-2013, representado como número de cepas por año. Sólo se muestran los ocho ST más abundantes que aparecen más de un año.

3.4. Análisis de la estructura de los dominios repetitivos del gen *k26*.

Para determinar la composición del dominio central repetitivo del gen *K26*, se secuenciaron los productos de PCR-K26 de 215 cepas de *L. infantum*. De las secuencias teóricamente traducidas a aminoácidos (a.a) se confirmó que el número de repeticiones de 14 a.a. se correlaciona con los tamaños obtenidos en los productos de PCR. Los datos de la variabilidad aminoacídica encontrada en las secuencias de distintas secuencias K26 (ST), incluyendo la composición de cada péptido, grupos asignados por secuencia, número de péptidos y la organización de las secuencias peptídicas encontradas en *L. infantum* se describen en las Tabla 31 Tabla 32. Nuestros resultados revelan que las secuencias de ADN de aislados españoles de *L. infantum* contienen un número variable de motivos repetitivos. Se identificaron 24 secuencias únicas agrupadas en 8 grupos, (que varían de 9-19 unidades repetidas), demostrando una enorme variabilidad en número y organización de la estructura peptídica de K26 (Tabla 32). Dicha variabilidad es similar a la observada en *L. donovani* y *L. major* (Depledge *et al.*, 2010; Zackay *et al.*, 2013). En todos los casos, se encontraron tres motivos conservados (A03, A10 y A19) que ocupan regiones en la parte inicial, central y la final de la cadena polipeptídica. Basados en la organización de los péptidos descritos anteriormente, cada ST-K26 posee una composición específica de aminoácidos que se usó como parámetro de agrupación en una serie de subgrupos bien definidos. Por ejemplo, el

genotipo ST-626 se dividió en dos subgrupos basándose en la presencia de un solo polimorfismo peptídico (A16 o A17), conformando el grupo 3 (Tabla 32). Es importante destacar que se identificaron diez subgrupos distintos (A-J) dentro del grupo 7 que corresponde a la ST-920, haciendo de esta secuencia K26 la más polimórfica hasta ahora descrita (Tabla 32).

Por otra parte, el péptido A00, previamente referido en otras especies de *Leishmania* pero no en *L. infantum*, fue frecuentemente reconocido en nuestras secuencias (ver grupos 4-7, Tabla 32) (Depledge *et al.*, 2010; Zackay *et al.*, 2013). No obstante, ninguno de los 13 miembros de la familia de los péptido B (por ejemplo, el péptido B8, PKEDDHAHSDGGG) descritos frecuentemente en *L. donovani*, se localizaron en las 174 secuencias de *L. infantum* estudiadas. Hasta la fecha, solo se ha reconocido la presencia del péptido B8 en un aislado de *L. infantum* analizado previamente (Maroof *et al.*, 2012).

Tabla 31. Secuencia de los aminoácidos que componen los péptidos de la proteína antigénica K26 (HASPb) en *L. infantum*.

Código del aminoácido*	Secuencia del Aminoácido
A03	PKEDG<u>H</u>TQKND<u>G</u>DG
A09	PKEDGHTQKNDGDA
A10	PKEDG <u>R</u> TQKNDGDG
A16	PKEDGHTQKND <u>D</u> G
A17	PKEDG <u>R</u> TQKND <u>D</u> G
A18	PKEDG <u>R</u> TQKN <u>N</u> GDG
A19	PKEDG <u>R</u> TQKNDG <u>G</u> G
A00	PKEDGHTQKNDG <u>G</u> G

*Todos los péptidos referidos en este estudio tienen secuencias de aminoácidos idénticas a las descritas por Maroof *et al.*, (2012). Cada péptido se compone de dos repeticiones de siete unidades de aminoácidos cada una. La primera repetición (PKEDGHT) sólo varía en la posición siete (subrayada), donde los residuos de histidina (H) o arginina (R) pueden estar indistintamente presentes. La segunda repetición (QKNDGDG) exhibió un mayor nivel de variación.

Tabla 32. Organización de la secuencia peptídica que compone el dominio central repetitivo de K26 en *L. infantum*. La secuenciación se realizó en 215 cepas (Anexo 1). Se presentan los grupos únicos por ST-K26 (1-8) derivado del tamaño del amplicón K26. La composición de cada uno de los 8 péptidos que componen la estructura (indicado con la letra A, numerada 00, 03, 09, 10, 16, 17, 18, 19) se muestran en la tabla 32. La posición y número de los péptidos en cada una de las ST varía de longitud (9 a 19 péptidos). Los péptidos conservados (parte inicial, central y terminal de la cadena) se señalan en negrita.

No. grupo	ST-K26	Subgrupo	No. péptidos	Organización de péptidos																		
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	542	n.a	9	A03	a17	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A19										
2	584	584 a	10	A03	A17	A03	A18	A09	A10	A10	A10	A03	A19									
		584 b	10	A03	A17	A03	A18	A03	A10	A10	A10	A03	A19									
3	626	626 a	11	A03	A16	A03	A18	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A19								
		626 b	11	A03	A17	A03	A18	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A19								
4	794	794 a	15	A03	A16	A03	A10	A18	A10	A10	A10	A03	A10	A00	A10	A00	A10	A19				
		794 b	15	A03	A03	A10	A18	A03	A09	A10	A10	A10	A10	A09	A10	A10	A00	A19				
5	836	836 a	16	A03	A16	A03	A10	A18	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A10	A00	A10	A19			
		836 b	16	A03	A16	A03	A10	A18	A10	A10	A10	A03	A03	A10	A00	A10	A00	A10	A19			
6	878	878 a	17	A03	A10	A18	A03	A09	A10	A10	A10	A10	A09	A10	A10	A03	A00	A10	A00	A19		
		878 b	17	A03	A16	A03	A10	A18	A09	A10	A10	A10	A03	A03	A10	A00	A10	A00	A10	A19		
7	920	920 a	18	A03	A16	A03	A10	A10	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A10	A00	A10	A00	A10	A19	
		920 b	18	A03	A16	A03	A10	A18	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A10	A00	A10	A00	A10	A19	
		920 c	18	A03	A03	A03	A10	A03	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A10	A03	A03	A03	A03	A19	
		920 d	18	A03	A03	A03	A10	A10	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A10	A03	A03	A03	A03	A19	
		920 e	18	A03	A03	A03	A10	A10	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A10	A03	A10	A00	A10	A19	
		920 f	18	A03	A03	A10	A18	A03	A09	A10	A10	A10	A10	A09	A10	A10	A03	A00	A10	A00	A19	
		920 g	18	A03	A03	A10	A10	A10	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A10	A03	A03	A03	A10	A19	
		920 h	18	A03	A03	A10	A10	A03	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A10	A10	A03	A03	A10	A00	A19	
		920 i	18	A03	A03	A10	A10	A03	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A10	A10	A03	A03	A10	A03	A19	
		920 j	18	A03	A03	A10	A10	A03	A09	A10	A10	A10	A10	A09	A10	A10	A03	A00	A10	A00	A19	
8	962	962 a	19	A03	A03	A03	A10	A18	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A03	A10	A00	A10	A00	A10	A19
		962 b	19	A03	A03	A03	A10	A10	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A03	A10	A00	A10	A00	A10	A19
		962 c	19	A03	A16	A03	A10	A10	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A03	A10	A00	A10	A00	A10	A19
		962 d	19	A03	A16	A03	A10	A18	A09	A10	A10	A10	A10	A03	A03	A03	A10	A00	A10	A00	A10	A19

n. a= no aplica, dado que solo se encontró un tipo de secuencia en todos los aislados analizados.

3.5. Variabilidad genética a nivel de zimodemas

De las 550 cepas consideradas en este estudio, un total de 344 (300 humanos y 44 caninos, respectivamente) estaban previamente caracterizadas con la técnica de tipado de isoenzimas. Nuestro conjunto de aislados comprendía 173 cepas de *L. infantum* MON-1 para las cuales se investigó la variabilidad inter e intrazimodema, dado que es el principal zimodema encontrado en la Región Mediterránea incluyendo España. El zimodema MON-1 se mostró como un grupo heterogéneo respecto al análisis de las secuencias tipo ITS, en el que se identificaron tres variantes genéticas distintas: ITS-A (91%, 158/173), ITS-LOMBARDI (8%, 13/173) e ITS-LISA (1%, 2/173).

Tabla 33. Variabilidad genética a nivel de zimodemas, mediante el genotipo ITS

No.	Zimodema	No. total de aislados por zimodema	Genotipos ITS			
			A	B	LOMBARDI	LISA
1	MON-1*	173	158	-	13	2
2	MON-24	71	10	-	59	2
3	MON-34	33	17	-	16	-
4	MON-27	3	1	-	2	-
5	MON-28	5	4	-	-	1
6	MON-29	9	5	1	-	3
7	MON-33	7	2	1	-	4
8	MON-273	1	1	-	-	-
9	MON-80	3	1	-	2	-
10	MON-108	1	1	-	-	-
11	MON-105	2	2	-	-	-
12	MON-183	10	5	-	5	-
13	MON-190	1	-	-	-	1
14	MON-198	1	1	-	-	-
15	MON-199	10	1	-	-	-
16	MON-253*	1	10	-	-	-
17	MON-273*	1	1	-	-	-
18	MON-282	1	1	-	-	-
19	MON-283	1	-	-	1	-
20	MON-284	2	2	-	-	-
21	MON-285	1	1	-	-	-
22	MON-302	7	5	-	2	-
23	MON-77*	1				

* MON-1, se consideran las 132 cepas de leishmaniasis humana y 41 de LCan

* MON-253, 9 cepas procedentes de leishmaniasis humana y 1 caso de LCan

*MON-273, exclusivamente de LCan

* MON-77, exclusivamente de LCan

Por otra parte, estudiamos 171 cepas pertenecientes a otros 22 zimodemas diferentes. Basados en la extensa variabilidad genética observada en este grupo, agrupamos las secuencias en las cuatro variantes descritas para las ITS: ITS-LOMBARDI (51%, 87/171), ITS-A (41%, 71/171), ITS-LISA (6%, 11 / 171), y ITS - B (1%, 2/171). No se observaron correlaciones entre zimodema y tipo de ITS. Se identificaron un total de 20 zimodemas diferentes dentro del genotipo ITS-A, mientras que se encontraron niveles de diversidad más bajos en el genotipo ITS-LOMBARDI (8 zimodemas), ITS-LISA (6 zimodemas) y finalmente ITS- B (2 zimodemas) (Tabla 33).

Una de las diferencias más significativas en los resultados de este estudio respecto a otras investigaciones, es la presencia de una mayor variabilidad dentro de los aislados de *L. infantum* MON-1 en el marcador K26. Además del amplicón de 626 pb previamente descrito en España (Gouzelou *et al.*, 2013; Haralambous *et al.*, 2008), nuestros resultados señalan al menos otros seis genotipos k26 (de producto de PCR de banda única), que fueron: 542, 584, 836, 878, 920, 962-bp. Los distintos amplicones de K26 encontrados en los diferentes zimodemas se describen en la Tabla 34. En general, esta información se utilizó para evaluar y comparar el poder de discriminación de los marcadores moleculares ITS y K26 sobre la base de los patrones isoenzimáticos descritos anteriormente. Además, estos datos permiten realizar una comparación directa con los resultados obtenidos en anteriores publicaciones sobre las que parten nuestra discusión más adelante.

Tabla 34. Variabilidad genética de *L. infantum* en la STs-K26 a nivel de zimodemas y su asociación con las secuencias tipo ITS.

Secuencias Tipo k26 (ST-K26) ^a	No. total ST-k26	Zimodemas		
		MON-1	Otros ^b	Desconocido ^c
542	1	1	-	-
584	3	1	-	2
626	163	101	24	38
794	4	-	2	2
836	12	1	9	2
878	15	3	9	3
920	151	14	49	88
962	87	4	54	29
≥1100	6	-	6	-
Doble banda ^d	31	6	14	11
N. A	2	1	1	-
Total	475	132	168	175

N.A= no amplifica; -, Ninguno

^a Los genotipos K26 o secuencias tipo (STs) son derivados del tamaño del amplicón y de la secuencia

^b Otros zimodemas diferentes a MON-1 (se incluyen 21 zimodemas)

^c Se desconoce el zimodema

^d Productos de PCR-K26 de doble banda en la electroforesis

3.6. Asociación de genotipos ITS y K26

Con el fin de aumentar la precisión de la diversidad genética encontrada mediante los dos análisis moleculares llevados a cabo, la variabilidad intraespecífica de *L. infantum* encontrada en las regiones ITS y el gen *k26* fue evaluada simultáneamente. Se identificaron un total de 17 genotipos asociados (ITS/K26) en las 550 cepas analizadas.

Tabla 35. Variabilidad genética de *L. infantum* en K26 y su asociación con los genotipos ITS.

(ST-K26) ^a	No. total ST-k26	ITS-A (n= 232)	ITS-B (n= 3)	ITS-LOMBARDI (n= 227)	ITS-LISA (n= 13)
542	1	1 (0,4%)	-	-	-
584	3	3 (1,3%)	-	-	-
626	163	163 (75%)	-	-	-
794	4	4 (1,7%)	-	-	-
836	12	5 (2,1%)	-	7 (3,1%)	-
878	15	7 (3,0%)	2 (66,7%)	6 (2,6%)	-
920	151	17 (7,3%)	-	126 (55,4%)	8 (61,5%)
962	87	14 (6,0%)	1 (33,3%)	70 (31%)	2 (15,4%)
≥1100	6	6 (2,6%)	-	-	-
Doble banda ^d	31	11 (4,7%)	-	17 (7,5%)	3 (23,1%)
N.A	2	1 (0,4%)	-	1 (0,4%)	-
Total	475	232	3	227	13

N.A= no amplifica; -, Ninguno

^a Los genotipos K26 o secuencias tipo (STs) son derivados del tamaño del amplicón y de la secuencia

^d Productos de PCR-K26 de doble banda en la electroforesis

El genotipo ITS-A se asoció con un amplio número de secuencias K26 que van desde 542 a ≥1.100 pb. Por lo tanto, se identificaron nueve genotipos asociados entre las 232 secuencias con genotipo ITS-A. Las relaciones más frecuentes fueron: A-626 (n= 163), seguido de A-920 (n= 17) y A-962 (n= 14) (Tabla 34). De forma más notable, las 227 secuencias de ITS-LOMBARDI sólo se encontraron asociadas con productos de PCR-K26 de tamaño medio y alto (836-962 pb). Como resultado de esta combinación encontramos siete variantes, principalmente: LOMBARDI (L)-920 (n= 126), seguido de L-962 (n= 70) y la combinación del genotipo mixto L-962/920 (n= 10). (Ver Tabla 34). Entre los resultados más significativos, se puede observar que el genotipo ITS-LOMBARDI nunca se encontró asociado con ST-626. Finalmente, ocho de los 13 genotipos ITS-LISA estaban predominantemente vinculados a ST-920.

4. DISCUSIÓN

Como es sabido, España es uno de los países con mayor número de casos reportados de leishmaniasis causada por *L. infantum* en Europa, pero actualmente se dispone de información muy limitada sobre la estructura de las poblaciones del parásito. En el Capítulo 1 se documentó la variabilidad intraespecífica de *L. infantum* en aislados de humanos en la CAM durante el período 2008-2012. Asimismo se reveló la diversidad molecular existente en los zimodemas más prevalentes en la región durante 1988-2005 (MON-1 y MON-24) (Chicharro *et al.*, 2013).

En este estudio retrospectivo se presentan nuevos datos de caracterización molecular y epidemiológica. Los marcadores moleculares empleados (ITS y *k26*) nos han permitido realizar un análisis de los elementos clave del ciclo de la enfermedad: vectores, reservorios y casos humanos, con el fin de establecer el posible origen y los genotipos circulantes de *L. infantum* en España durante los últimos 30 años.

Basados en la consistente figura que ofrece el análisis de las secuencias ITS en un área determinada, este locus proporciona una herramienta eficaz para explorar la variabilidad intraespecífica de *L. infantum*. Nuestros análisis moleculares revelan la presencia de cuatro genotipos, uno de ellos descrito aquí por primera vez (ITS-LISA) y tres descritos con anterioridad (ITS-A, ITS-B, y ITS-LOMBARDI) (Chicharro *et al.*, 2013; Kuhls *et al.*, 2005). Curiosamente, la gran mayoría (225/227) de los aislados tipados como ITS-LOMBARDI mostraron una marcada distribución geográfica, siendo identificados sólo en las regiones centrales, pero no en las costeras, del país. Además, las regiones ITS han demostrado su utilidad en la detección de la diversidad genética dentro del zimodema MON-1, encontrando 3 variantes genéticas: ITS-A, LOMBARDI y LISA. A pesar de que el análisis por MLEE muestra mayor variabilidad que el estudio de ITS, su valor es limitado en *L. infantum* MON-1, el zimodema más prevalente en España. Esto no quiere decir que las unidades de subtipado ITS puedan reemplazar el análisis tradicional mediante MLEE, pero la capacidad de exponer variabilidad a nivel intrazimodema le convierten en un buen “candidato” para ser utilizado como parte de un conjunto de marcadores moleculares que conformen el sistema de vigilancia molecular de las poblaciones de *L. infantum*. El estudio de las secuencias de las regiones ITS se utiliza frecuentemente en taxonomía y filogenia molecular porque a) es fácil de amplificar incluso a partir de pequeñas cantidades de ADN, debido al elevado número de copias, y b) tiene un alto grado de variabilidad incluso entre especies estrechamente relacionadas. Esto puede explicarse debido a la presión evolutiva relativamente baja que actúa sobre tales secuencias no funcionales (Hillis & Dixon, 1991). Como muestra de ello, este marcador se ha empleado en la caracterización genética de diferentes especies de *Leishmania* y su asociación con varios aspectos epidemiológicos (Cupolillo *et al.*, 2003; El Tai *et al.*, 2001; Parvizi *et al.*, 2008; Schönian *et al.*, 2001; Tashakori *et al.*, 2006).

El análisis de K26 mostró un alto grado de polimorfismo entre aislados de diversas regiones y diferentes hospedadores. Las nueve STs descritas aquí (con tamaños de 542 a 1.300 pb) representan una variación genética importante dentro de *L. infantum*, que podría reflejar la plasticidad de estos parásitos y la capacidad para adaptarse a las cambiantes condiciones ecológicas.

Previamente se había propuesto que los amplicones de 940 pb y 870 pb estaban restringidos geográficamente a Grecia (Gouzelou *et al.*, 2013). Sin embargo, en nuestro estudio hemos identificado amplicones-K26 de 836-bp, 878-bp, 920-bp y 962-bp, lo cual indica que los tamaños de K26 no pueden utilizarse como códigos de identificación específicos para una determinada región. Por otra parte, nuestros resultados de caracterización del gen *k26* de *L. infantum* MON-1 revelaron gran variabilidad intraespecífica, incluso dentro de un mismo zimodema. En contraste con datos previos que únicamente identificaban el tamaño de 626 pb en la región Mediterránea (Gouzelou *et al.*, 2013; Haralambous *et al.*, 2008). Nuestro estudio pone de manifiesto al menos 7 variantes de este gen. Nuestros datos indican que el amplicón de 626 pb no es exclusivo de *L. infantum* MON-1, lo que confirma la falta de asociación entre el zimodema y el tipo de ST-K26, en discrepancia con la reciente hipótesis planteada por Gouzelou *et al.*, (2013). Además, ST-626 está presente en al menos otros siete zimodemas presentes en España.

Respecto a la elevada variabilidad observada en el marcador K26, nuestros resultados apoyan la propuesta de otros autores que consideran que los patógenos que producen muchas variantes genéticas son más propensos a infectar múltiples hospedadores (Woolhouse *et al.*, 2001).

En línea con estudios moleculares preliminares realizados en *L. donovani*, nuestros resultados también demostraron un alto nivel de variabilidad en la composición y reordenamiento de los motivos repetidos en el locus K26 de *L. infantum*. Sin embargo, es la primera vez que se dedica especial atención a la composición de este gen en *L. infantum*, ya que en anteriores trabajos se habían incluido solo de 2 a 6 cepas para el análisis de esta especie (Depledge *et al.*, 2010; Maroof *et al.*, 2012; Zackay *et al.*, 2013). Una característica interesante de K26 es la presencia de dos repeticiones alternadas de siete unidades de aminoácidos cada una. La primera repetición (PKEDGHT) sólo varía en la posición seis (subrayada también en la Tabla 32), donde los residuos de histidina o arginina pueden estar indistintamente presentes. La segunda repetición (QKNDGDG) exhibe una mayor de variabilidad. En resumen, se identificaron cadenas polipeptídicas que varían de 9 a 19 péptidos distintos, en contraste con los datos obtenidos para cepas de *L. infantum* de Brasil (AF131228), Francia (EF504256, EF504255) y Grecia (EF504258, EF504257) en las que solo se habían identificado 11 péptidos, asociados al único tamaño encontrado (626 pb) por estos autores (Zackay *et al.*, 2013)

En este sentido, nuestro análisis confirma que las deleciones y duplicaciones de segmentos genéticos (variaciones de número de copias o CNV) constituyen una fuente importante de variabilidad dentro de *L. infantum*. Estos hallazgos se confirmaron mediante el análisis de las secuencias de ADN de 215 productos de PCR-K26 que se agruparon en 24 subgrupos de secuencia única de acuerdo al tamaño de ST-K26 y organización peptídica en el locus *haspb*. Un ejemplo de la utilidad de esta herramienta es la descripción de la alta variabilidad encontrada en esta familia polimórfica de proteínas de membrana, donde la ST-920 incluye hasta 10 variantes en su estructura.

El papel que juega la variabilidad genética de *k26* en la interacción entre el hospedador y el vector no está del todo claro y debe investigarse aún más en profundidad. Sin embargo, dos teorías apoyadas por diferentes autores parecen recaer sobre nuestro análisis. La primera, es que la variabilidad encontrada es consecuencia de un proceso de adaptación selectiva a diferentes hospedadores vertebrados e insectos vectores como ha sucedido en *L. major* (Depledge *et al.*, 2010; Schnur & Jacobson, 1989). La segunda, plantea que los dominios repetitivos en tándem de proteínas antigénicas de superficie pueden sobre-estimular la población de células B, contribuyendo a un desequilibrio entre la respuesta inmune Th1/Th2 en favor de la respuesta humoral (tipo Th2), que hace que la infección prospere con más facilidad evasión de la respuesta inmune del hospedador (Anders, 1986; Kemp *et al.*, 1987).

En referente al tamaño variable de K26, algunos ejemplos de este fenómeno de delección y/o amplificación asociados a diferentes grados de virulencia, ya se ha descrito en otras especies de *Leishmania* (Inga *et al.*, 1998; Wickstead *et al.*, 2003). Concretamente, en *L. (V.) peruviana* se ha observado menor virulencia en cepas con delección de un fragmento cromosómico de *gp63* (K Victoir *et al.*, 1995). Asimismo, en *L. infantum* los parásitos menos patógenos presentan menor número de copias de genes que codifican para antígenos superficiales (PSA-2) (Bras-Gonçalves *et al.*, 2014).

Por otra parte, al analizar la distribución temporal que nos ofrece este marcador molecular a lo largo del tiempo, se encontró que el genotipo ST-626 era dominante en la mayoría de los años desde 1986. Sin embargo, los datos sobre el período 2006-2009 revelaron un cambio significativo en la frecuencia de los genotipos ST del parásito, con ST-626 y ST-920 estando presentes en proporciones aproximadamente iguales. A partir de 2010 esta tendencia fue revertida completamente y el genotipo ST-920 se convierte en la variante predominante, siendo identificado en el 62% de los casos humanos investigados y más del 80% si consideramos la totalidad de cepas con tamaños superiores a ≥ 920 pb (ST-962 y ST-962/920). Sin embargo, este resultado puede verse afectado por un sesgo implícito en el muestreo, ya que el alto número de estas formas de K26 (ST-920) se han identificado en las cepas aisladas en los años debidos al brote en Madrid.

No obstante, esta misma tendencia se observó para muestras tomadas en diferentes años sólo en Madrid. El considerable aumento de los casos con la presencia del genotipo ST-920 puede reflejar un aumento de la virulencia de esta cepa asociado al mayor número de copias y la estructura molecular en este locus. El alcance de esta hipótesis debe confirmarse en futuros estudios moleculares.

Los datos presentados aquí demuestran que varios genotipos de *L. infantum* están siendo transmitidos en un mismo contexto entre poblaciones humanas, caninas y flebótomos a través de una variedad de ciclos específicos. *L. infantum* A-626 parece mantenerse exclusivamente en un ciclo doméstico que implica a perros y seres humanos en zonas rurales y urbanas de España. Por otra parte, *L. infantum* L-920 ha sido identificado en los 10 ejemplares de *P. perniciosus* examinados aquí, pero nunca se encontró en perros infectados. El hecho de que el genotipo L-920 sea el responsable de la mayoría de los casos de leishmaniosis humana documentada en los últimos años en Madrid y que el genotipo ITS-LOMBARDI nunca se ha encontrado asociado a ST-626, nos sugiere la existencia de un reservorio silvestre con un genotipo específico para que el parásito pueda mantenerse y destacar en la epidemiología actual de la enfermedad. En el marco de la vigilancia de fauna silvestre, desde el año 2011 hasta la fecha, se ha llevado a cabo el análisis de muestras biológicas de liebres y conejos procedentes de la zona en estudio mediante una PCR específica para la detección de ADN de *Leishmania* y se ha demostrado que todas las liebres y conejos del área de Madrid poseen el genotipo ITS-LOMBARDI (Vilas, 2017). Además, su capacidad infectiva ha sido demostrada previamente mediante xenodiagnóstico (Molina *et al.*, 2012). Este hecho corrobora el papel relevante que están desempeñando los reservorios silvestres en el ciclo de transmisión de *Leishmania* en la Comunidad de Madrid.

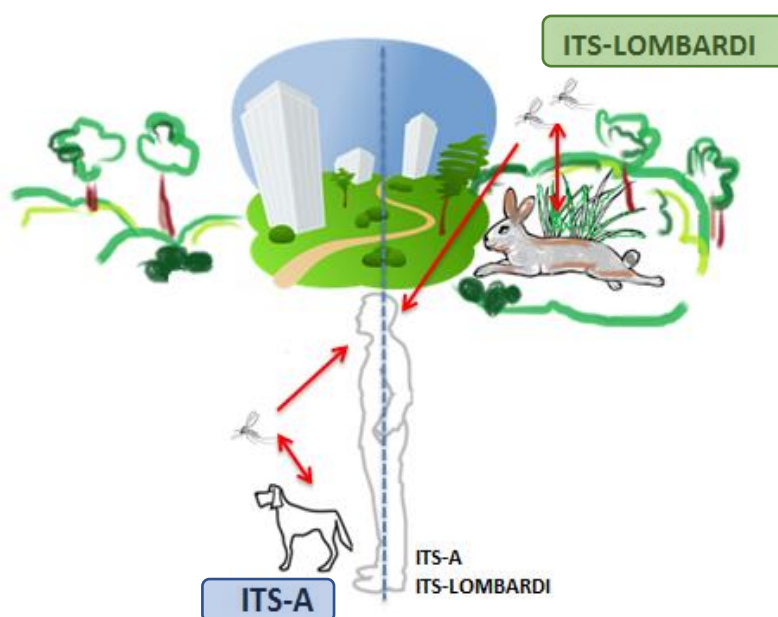


Figura 42. Asociación de los genotipos ITS-A e ITS-LOMBARDI a los ciclos de transmisión de *L. infantum* en el área urbana del Suroeste de Madrid.

En conjunto, estos datos indican que las liebres pueden actuar como reservorio adecuado de *L. infantum* L-920 (asumiendo que LOMBARDI se asocia en su mayoría con amplicones de 920 pb, como se ha demostrado en los casos humanos de Madrid) y por tanto, ser la fuente de las infecciones humanas detectadas en el mismo área como consecuencia de la superposición de los ciclos silvestres-domésticos en un área urbanizada recientemente (Figura 42). La existencia de un ciclo urbano para *L. infantum* en el que se involucran especies de flebótomos peridomésticos refleja la capacidad de estos parásitos y sus vectores para adaptarse a los cambios de su hábitat original con importantes implicaciones en la salud pública. Sin embargo, también debe tenerse en cuenta que en muchos casos la infección de un determinado hospedador tiene un carácter oportunista y ocurren cuando surgen las circunstancias adecuadas. Además, es importante tener en cuenta que la incursión humana en los hábitats de vida silvestre también puede tener un papel en la dinámica de transmisión de la leishmaniasis (R. C. A. Thompson *et al.*, 2009).

Un factor limitante de este estudio es que todos los aislados analizados se obtuvieron durante el diagnóstico de rutina de muestras sometidas al CNM-ISCIH por distintos hospitales para su diagnóstico, investigaciones de brotes o estudios de campo, que no necesariamente reflejan todas las regiones y contextos en que circula *L. infantum*. Algunas áreas geográficas podrían estar infrarepresentadas.

Para el estudio epidemiológico y el seguimiento de la variabilidad intraespecífica de *L. infantum*, se necesitan métodos altamente discriminatorios y comparables para diferenciar *Leishmania* a nivel de cepa. Sin embargo, es necesario normalizar una nomenclatura de genotipos habilitados entre laboratorios, proporcionando así un método de tipado aplicable en un sistema de vigilancia molecular orientada al control. Técnicas adicionales tales como MLSA (*Multilocus Sequencing Analysis*) y la aplicación de los métodos propuestos en un gran número de cepas de la región Mediterránea podrían proporcionar una mejor comprensión de la dinámica y tendencias de la circulación del parásito (tema que se abordará con más detalle en el Capítulo 3 de esta memoria).

En conclusión, hemos demostrado que estos marcadores moleculares (ITS1, ITS2 y *k26*) son marcadores ventajosos en estudios de epidemiología molecular, los cuales permiten identificar la variabilidad genética del parásito y ayudan a entender la dinámica de transmisión de *L. infantum* en las zonas donde los ciclos silvestres, domésticos y peri-domésticos del parásito se pueden solapar. Además, pueden ser extremadamente útiles en sistemas de vigilancia, para la identificación y monitorización de variantes genéticas emergentes. Esperamos que la información proporcionada utilizando este enfoque metodológico pueda utilizarse para mejorar los actuales programas de control.

Capítulo 3.

Estudio de la estructura de poblaciones de *Leishmania infantum* en España mediante el análisis de secuencias multilocus (*Multilocus Sequence Analysis, MLSA*).

1. ANTECEDENTES

Leishmania infantum es el agente causal de la leishmaniasis en España, esta especie se distribuye también por todo el sur de Europa, norte y este de África, Oriente Próximo, Asia Central y América Latina (WHO, 2010). A pesar de su amplia distribución, su estudio ha merecido menos atención que otras especies de *Leishmania*, y aún existen muchos aspectos desconocidos en relación a su transmisión y patogénesis. *L. infantum* se asocia principalmente con la LV y con formas benignas de LC. Sin embargo, en condiciones de inmunodepresión puede causar casi cualquier forma de leishmaniasis (Cruz *et al.*, 2006). Sí que se ha comprobado que *L. infantum* presenta una gran diversidad genotípica, la cual podría manifestarse en una distinta virulencia que, en interacción con la respuesta inmunológica del hospedador, condicionaría la manifestación clínica y la eficacia terapéutica (Cunha *et al.*, 2013; Garin *et al.*, 2001).

La capacidad de caracterizar las distintas variantes genéticas de *Leishmania* permite entender diferentes aspectos de la epidemiología de la leishmaniasis, ayudando a desarrollar medidas para contrarrestar su propagación. Como hemos explicado anteriormente, existe una amplia gama de herramientas moleculares disponibles para la investigación de la epidemiología de la leishmaniasis. Sin embargo, sigue sin existir un consenso sobre qué marcadores y/o métodos emplear (Schönian *et al.*, 2011), necesitándose además una aproximación metodológica que permita a la comunidad científica el acceso abierto a los resultados.

En 1998, se propuso el tipado de secuencias multi-locus (MLST; o análisis de secuencias multi-locus, MLSA) como una herramienta que podría aplicarse a distintos patógenos. El análisis mediante MLSA combina la secuenciación, la bioinformática y la genética de poblaciones para proporcionar un sistema de tipado reproducible y escalable que evidencia la variación intraespecífica en diferentes organismos, permitiendo definir sus poblaciones e historia evolutiva (Maiden *et al.*, 1998). El MLSA se ha empleado en el estudio de una gran variedad de patógenos, procariotas y eucariotas, y los datos generados han contribuido tanto a la vigilancia epidemiológica como a los estudios fundamentales de la biología del patógeno (Achtman *et al.*, 2012; Odds, 2010). Esta metodología consiste en el análisis de la secuencia de ADN de distintas dianas del genoma del parásito, preferiblemente regiones de genes *housekeeping*, siendo capaz de determinar polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) co-dominantes. A cada tipo de secuencia identificado en las distintas dianas se le asigna un haplotipo, y la combinación de estos conforma la secuencia tipo o genotipo. La gran ventaja de esta metodología es que los datos de secuencias de ADN son muy reproducibles y fáciles de comparar entre laboratorios y, por tanto, adecuados para ser compartidos en bases de datos públicas.

Los primeros protocolos de MLSA para el estudio de *Leishmania* se han desarrollado empleando loci que codifican para los mismos genes que codifican las enzimas empleadas en el sistema MLEE, considerado durante décadas el método estándar para el tipado de *Leishmania*. Aunque estos estudios mostraron una concordancia aceptable entre MLSA y MLEE, también destacaron algunas discrepancias debido a la mayor resolución de los MLSA (Boite *et al.*, 2012; Mauricio *et al.*, 2006; Tsukayama *et al.*, 2009; Zemanová *et al.*, 2007).

En el contexto del Viejo Mundo el análisis por MLSA se ha centrado principalmente en el análisis de cepas del complejo de *L. donovani*, utilizando diez marcadores diferentes basados en los genes que codifican las enzimas estudiadas en el MLEE (Mauricio *et al.*, 2006; Zemanová *et al.*, 2007). Más recientemente, El Baidouri *et al.*, (2013) desarrollaron un protocolo de MLSA, basado en otro conjunto de genes, que aplicaron en 222 cepas de 10 especies distintas de *Leishmania* de diferentes regiones de Eurasia y África, siendo capaces de clasificar las diferentes cepas en siete grandes grupos que mostraron una congruente señal filogenética. Aunque el potencial del MLSA no ha sido plenamente explotado, los autores sugieren que debería tener consecuencias sobre la taxonomía, la comprensión de la epidemiología y el manejo terapéutico de la leishmaniasis (El Baidouri *et al.*, 2013).

La aplicación de un sistema MLSA requiere una evaluación cuidadosa de los marcadores para estudiar su diversidad y coherencia filogenética. Con este propósito, el objetivo del Capítulo 3 ha sido avanzar en el conocimiento de la estructura de poblaciones de *L. infantum* de España validando el mismo panel de 7 marcadores multilocus previamente descritos por El Baidouri *et al.*, (2013). Para ello determinaremos la diversidad genética de cepas de *L. infantum* aisladas en España a partir de diferentes hospedadores/reservorios (humano, perro y flebótomos).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas de *L. infantum*

Con el fin de realizar un análisis de MLSA con cepas de *L. infantum* que representasen el contexto geográfico de la cuenca mediterránea, y haciendo énfasis en España, se seleccionó un conjunto de 385 cepas de *L. infantum* o la información genética correspondiente relevante para el estudio mediante MLSA. Este conjunto consistió en 295 aislados de *L. infantum* de España, de la colección del Centro Colaborador de la OMS para leishmaniasis. Y se completó con las secuencias de ADN correspondientes a los 7 genes del panel de marcadores empleados en el protocolo de MLSA descrito por El Baidouri *et al.*, (2013) de 90 cepas de *L. infantum*, obtenidas

en 23 países diferentes de Eurasia y África y previamente analizadas por los mismos autores (Figura 43, Anexo 4).

Trescientos dos aislados (78.4%) se obtuvieron de pacientes, 70 (18.1%) de reservorios mamíferos y 12 (3.1%) de flebotomos. Para el 76.6% de las cepas, se disponía de datos de tipado MLEE, 160 (42%) de ellas eran MON-1, el zimodema más frecuente en la región mediterránea. En las otras 135 (35%) se describieron hasta 38 zimodemas diferentes, representados por al menos una cepa. En el Anexo 4, se describen las cepas utilizadas en este estudio, indicando tanto su procedencia como el zimodema al que pertenecen (cuando existe esa información).

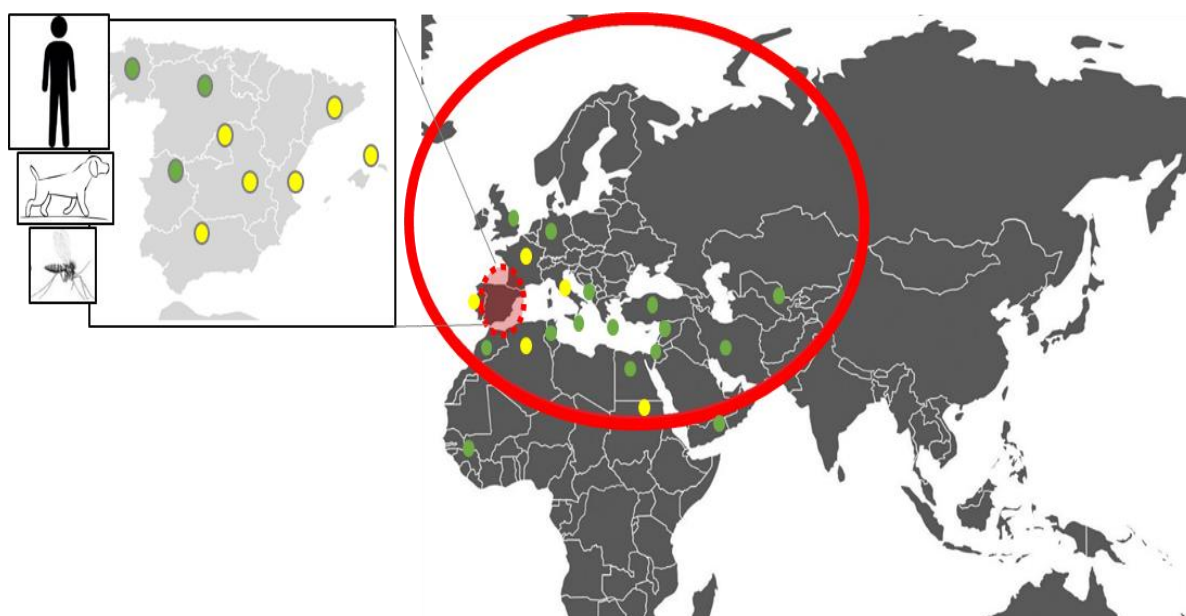


Figura 43. Países y regiones de España de procedencia de las cepas de *L. infantum* incluidas en el análisis. En verde: países/regiones de los que se incluyen 3 cepas o menos; en amarillo: países/regiones de los que se incluyen más de 3 cepas.

De las cepas procedentes de España, 230 fueron aisladas de casos humanos, 53 de perros y 10 de flebotomos procedentes de 9 regiones (Andalucía= 15; Madrid= 214; Valencia= 11; Castilla La Mancha= 11, Castilla y León= 3; Cataluña= 17; Extremadura= 5; Galicia= 2; Islas Baleares= 15). De las 214 cepas de Madrid, 79 fueron aisladas durante un periodo que solapa con el brote de leishmaniasis de la CAM (2008-2012), y son cepas que han sido previamente estudiadas en los Capítulos 1 y 2.

Se incluyeron en el análisis 2 cepas de referencia de la OMS, ambas *L. infantum*: MCAN/ES/98/LLM-724 de España y MHOM/FR/78/LEM-75 de Francia.

2.2. Extracción de ADN y amplificación de los siete marcadores moleculares

Los promastigotes se descongelaron rápidamente (utilizando un criovial por cepa) y el ADN se extrajo utilizando el kit comercial QIAmp® *DNA mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante, y ajustando la concentración de ADN a 10 ng/μl, como se describe en materiales y métodos (Apartados 4.1 y 4.1.1.).

A partir del ADN extraído se amplificaron los 7 loci que conforman el panel de marcadores de MLSA (El Baidouri *et al.*, 2013): locus 03.0980 (*subunidad alfa del factor de iniciación de la elongación*), 04.0580 (*espermina sintasa*), 10.0560 (*proteína de tipo deshidrogenasa ligante de Zinc*), 12.0010 (*subunidad alfa del factor de iniciación de traducción*), 14.0130 (*proteína similar a la nucleósido hidrolasa*), 31.0280 (*proteína hipotética conservada*), 31.0280 (*subunidad grande de la ARN polimerasa II*). Todos los marcadores moleculares incluidos en este estudio son regiones de ADN codificante (CDS) correspondientes a una serie de genes *housekeeping*. Estos genes se distribuyen a lo largo del genoma de *Leishmania*, localizándose en la región central o telomérica de seis cromosomas diferentes, por lo que se les considera unidades genéticas independientes. La función biológica de los genes analizados no fue considerada por El Baidouri *et al.*, (2013) como un criterio para la selección de locus.

Para la amplificación de los distintos genes se emplearon las siguientes parejas de oligonucleótidos, que generaron productos de 486 a 810 pb, según el gen:

- **Locus 03.0980:** 030F: 5'-AGT CCC GAA ACT GTG GAC TA-3' y 030R: 5'-GAC GGA GAG GTG GAT CTG AG-3;
- **Locus 04.0580:** 040F: 5'- CAG GCC CTG GTC TTC TGC - 3 y 040R: 5'- GTG CAT GTC GCT GCT GTA AT - 3';
- **Locus 10.0560:** 100F: 5'- GAG AAG CCA GCC TTG AAG TG - 3 y 100R: 5'- GAA GAC GTA GTG CAC CGA CA - 3';
- **Locus 12.0010:** 120F: 5'- AGA GGA TGG ACG TCC CAA G - 3 y 120R: 5'- CAG AAG GAG CCG TGT GAA A - 3';
- **Locus 14.0130:** 140F: 5'- GAA CCA GGG AAT GGA GAA CA - 3 y 140R: 5'- TTC CAA GAA GCG AGC GTT AT - 3';
- **Locus 31.0280:** 310F: 5'- ATG AGG CGT CTC CTT CAC AA - 3 y 310R: 5'- CGG CGT TCT TGA GTG CTT - 3';
- **Locus 31.2610:** 312F: 5'- AAG TAC CAG CAG TCC CTC ATC - 3 y 312R: 5'- GCA GCC GCA CAA TGC GCT - 3'.

En todos los casos se emplearon los mismos componentes de reacción y programa de amplificación, a excepción de los oligonucleótidos utilizados en cada PCR (ver Apartado 3.5.1.4 de Materiales y Métodos). La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 50 µl y consistió en 5 µl de tampón de reacción 10 x (que contiene 20 mM de MgCl₂, Biotools®), 1 µl de dNTPs (Biotools®), 15 µM de cada cebador, 1 µl de ADN polimerasa (1 U/µl, Biotools®), 5 µl de ADN (10 ng/µl), y agua destilada, hasta completar un volumen de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron de 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 54°C durante 1 min y 72°C durante 1 min y 30 seg, con una extensión final a 72°C durante 10 min.

2.3. Secuenciación de los productos de PCR

Se realizó la secuenciación directa de las dos hebras de los 2.065 productos de PCR, utilizando los mismos cebadores que en la amplificación y siguiendo el protocolo de secuenciación descrito con anterioridad (Materiales y Métodos, Apartado 8).

2.4. Análisis de secuencias e interpretación de los perfiles alélicos

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y ensambladas mediante el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Como *Leishmania* se considera principalmente un organismo diploide, se prestó atención especial a las posiciones heterocigóticas (Rogers *et al.*, 2011). Los cromatogramas de ambas hebras se examinaron visualmente y se interpretaron posiciones heterocigóticas cuando dos picos se superponían en la misma posición del cromatograma. Estos sitios ambiguos (heterocigotos) se codificaron usando los códigos IUPAC estándar para combinaciones de dos o más bases (JCBN, 1999). Los sitios ambiguos se consideraron como dos posibles alelos para todos los marcadores.

La asignación de alelos se realizó mediante comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en el Genbank por El Baidouri *et al.*, (2013), teniendo como referencia las secuencias correspondientes a la cepa MHOM/FR/78/LEM75: (gen/Nº de acceso en GenBank) 03.0980/KC159255, 04.0580/KC159477, 10.0560/KC159033, 12.0010/KC159699, 14.0130/KC158811, 31.0280/KC159921 y 312.2610/KC158589.

Para calcular el número de alelos para cada locus se empleó el software *MLSTest v.1.0.1* (Tomasini *et al.*, 2013). A cada una de las secuencias de los 7 genes le fue asignado un número que identifica a cada alelo (ST), y a la combinación de perfiles alélicos se le asigna un tipo de secuencia (llamada aquí LST, de *Leishmania* Sequence Type). En las cepas heterocigotas se

consideró la combinación de los dos alelos para definir el genotipo, mientras que en las cepas homocigotas se consideró un único alelo posible.

La reconstrucción de los haplotipos se realizó utilizando el algoritmo PHASE del programa *DnaSP* v.5 (Librado & Rozas, 2009), que asigna automáticamente un número de haplotipo para cada secuencia haploide única. Así mismo este programa se utilizó para calcular el número de sitios nucleotídicos variables (S), el contenido nucleotídico (G+C), la diversidad haplotípica (Hd) y la relación entre las tasas de sustitución sinónima y no sinónima (dN/dS). Con el objetivo de determinar si los marcadores empleados evolucionan neutralmente se llevó a cabo el test de neutralidad de Tajima´ D (Tajima, 1989) efectuado con este mismo programa.

2.5. Análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas para cada gen se concatenaron usando el programa *BioEdit* v7.0.9 (Hall, 1999) para evaluar la información filogenética proporcionada por los siete marcadores. De modo que pudo realizarse tanto un análisis de las secuencias de cada gen como de las secuencias concatenadas. En las posiciones ambiguas se duplicaron los nucleótidos para evitar la pérdida de información (por ejemplo, Y a C/T).

Se realizó un análisis de las distancias genéticas mediante la construcción de un árbol filogenético de acuerdo con la proporción de alelos compartidos, utilizando el programa *MLSTest*. La matriz de distancias resultante fue procesada por *PHYLIP* v3.6 (Felsenstein, 1993) para construir un árbol con el método de *Neighbor-Joining* (NJ) (Hall, 2011). También se construyó un árbol, en base a los caracteres, mediante el método de Máxima Verosimilitud (ML) usando *PhyML* v 3.0 (Guindon *et al.*, 2010). El mejor modelo de evolución para explicar la sustitución de nucleótidos en las secuencias a analizar se identificó a mediante el criterio de información de Akaike (AIC) y el criterio de Información Bayesiano (BIC) utilizando el programa *JModelTest* (Posada, 2008). El modelo General de Tiempo Reversible (GTR) fue el seleccionado, incluyendo la proporción de sitios invariables (I) y variación en la tasa de distribución gamma (G) (es decir, se seleccionó el modelo GTR + I + G).

La robustez de la topología de los árboles se obtuvo por remuestreo (*bootstrap*) con 1000 repeticiones. Un árbol de consenso para los 7 genes, un representante por secuencia tipo (LST), fue editado en *FIGTREE* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

2.6. Análisis de la estructura de las poblaciones

Para inferir la estructura de poblaciones en la muestra de estudio se realizó un análisis bayesiano en el programa *STRUCTURE* v 2.3.4. Los alineamientos de las secuencias haploides contenidas tanto en los alelos homocigotos como los heterocigotos fueron importados al software *STRUCTURE* 2.3.4 (Universidad de Chicago, IL, EEUU). Utilizando un enfoque estadístico bayesiano, *STRUCTURE* aplica un modelo basado en el método de agrupación para inferir la estructura de los individuos en los grupos utilizando los datos de MLSA. Este algoritmo identifica clústeres genéticamente distintos (K) según la frecuencia de los alelos atribuyendo la fracción de cada genotipo en cada muestra (Pritchard *et al.*, 2000). Para este análisis se utilizó el modelo de mezcla (*admixture*), que correlaciona las frecuencias de los alelos entre las poblaciones y calcula la proporción del genoma de un individuo procedente de diferentes poblaciones inferidas, junto con las distancias de cada una de estas. Para ello, se realizaron búsquedas con el método de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), usando 200.000 iteraciones para cada valor de K (el número de poblaciones) que fueron consideradas entre K=1 y K=10. Se realizaron 10 simulaciones para cada valor de K (Mau *et al.*, 1999). El número más apropiado de poblaciones fue determinado basado en la estadística *ad hoc* ΔK (definido como la tasa de variación de la probabilidad de registro de datos entre valores sucesivos de K), el cual proporciona el valor K más probable para los datos (Evanno *et al.*, 2005) y que se utilizan posteriormente en el programa *STRUCTURE HARVESTER* V0.6.92 (Earl & vonHoldt, 2012). Este último se utiliza para generar los gráficos para el cambio en el registro de K y calcula los ΔK de los resultados de *STRUCTURE*, que se comparan para elegir el valor de K que mejor se ajuste a los datos.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis descriptivo de los siete genes que componen el sistema multilocus

Se realizó con éxito la amplificación y secuenciación de las 295 cepas procedentes de la colección del Centro Colaborador de la OMS para la Leishmaniasis (CCL-OMS) aisladas en España, que junto con las secuencias obtenidas del GenBank conformaron las 385 cepas de *L. infantum* estudiadas en este capítulo. En total, 312 cepas de España y 73 de 22 países diferentes de Eurasia y África. (Anexo 4).

El alineamiento múltiple consistió en 2.065 secuencias consenso generadas de novo a partir de las cepas de la colección del CCL-OMS, y 630 secuencias obtenidas del Genbank, generadas por El Baidouri *et al.*, (2013). La secuencia de los 7 genes concatenados estaba compuesta de 4.677

pb, y en esta se identificaron 120 sitios polimórficos, incluyendo 115 sitios informativos de parsimonia y 5 polimorfismos de un único nucleótido (SNP) (Tabla 36). Dependiendo del locus analizado, el número de sitios polimórficos osciló entre 8 (locus 31.2610) a 28 (locus 03.0980) y el porcentaje de sitios polimórficos de 1,6%– 4,1%, respectivamente (media = 2,5%), los cuales eran mayoritariamente informativos (aquellos donde hay más de un carácter que esté representado al menos dos veces). Las regiones estudiadas del locus 10.00560 y del 12.0010 presentaban mayor número (2) y porcentaje (0.3%) de SNPs, en relación con el tamaño total de la secuencia, a diferencia de los otros cinco genes (0% -0,1%) (Tabla 36). Las frecuencias genotípicas se ajustaron al equilibrio H-W (test exacto), y al test de neutralidad de Tajima *D* los cuales fueron significativos estadísticamente (<0.01). Las frecuencias alélicas fueron similares en los siete grupos nativos excepto para 040.0580, con diferencias significativas únicamente en este marcador. La diversidad haplotípica varió en el rango de 0.195 (locus 04.0580) a 0.849 (locus 31.0280). Esto puede deberse al escaso flujo genético que pueda existir entre las poblaciones de *L. infantum* de España y el resto de países (ej. Sudán, Italia), además de la deriva genética sufrida por estos últimos, que puede contribuir a incrementar las diferencias, como sugieren los valores del test de Tajima *D* (Tabla 36). Sin embargo, el análisis estadístico de la presión de selección ejercida sobre los siete loci indicó que tanto la relación dN/dS como la relación transición/transversión (R) estaban fuertemente sesgadas hacia mutaciones sinónimas (dN/dS varió de 0,012 a 0,245 y R de 1,36 a 6,57). Esto se debe probablemente a la contra-selección de mutaciones deletéreas durante la evolución de estos genes. Esta selección de purificación tan fuerte se espera siempre en los genes *housekeeping* con el fin de asegurar el correcto funcionamiento de la maquinaria molecular básica de la vida. En cuanto al contenido nucleotídico, este fue similar entre los genes analizados y varió entre el 52% y 62%.

Aunque la mayoría de las cepas eran homocigotas, un 20% (80/385) de la muestra analizada tenía al menos un locus en heterocigosis. Los sitios ambiguos fueron observados en 37 posiciones en los siete genes analizados (Tabla 36). El número de sitios heterocigotos fue similar en tres regiones de genes, pero mucho menor para el locus 04.0580 y 14.0130, que tenían un número menor de cepas con picos dobles en sus secuencias (2 y 3, respectivamente) en comparación con las otras dianas (Tabla 36). En todos los marcadores se observaron diferentes cepas que presentan picos dobles (heterocigotos) en el mismo sitio, excepto en el locus 04.00580 que fue el que más alelos homocigotos presentó, aunque no fuese el más conservado, en concordancia con el número de sitios segregantes/polimórficos que este presentó. Los marcadores moleculares 12.0010, 31.0280 y 31.2610 presentaron más de un doble pico por cepa y más de una cepa con heterocigosis (Tabla 36).

Tabla 36. Parámetros de diversidad genética de los loci estudiados en las 385 cepas incluidas en el presente estudio.

Locus	Gen	Tamaño (pb)	h	Hd	S (%)	SNPs	SIP	G+G	d _N /d _S	Tajitma' D	No. SH	No. cepas diploides
03.0980	Subunidad alfa del factor de iniciación de elongación (030)	678	30	0,644	28 (4,1%)	1	27	0,56	0,012	-2,249	9	25
04.0580	Espermina Sintasa (040)	711	15	0,195	15 (2,1%)	0	15	0,61	0,110	-2,167	2	2
10.0560	Proteína de tipo deshidrogenasa ligante de Zinc (100)	636	27	0,621	19 (3,0%)	2	17	0,62	0,095	-1,922	7	15
12.0010	Subunidad alfa del Factor de Iniciación de la traducción (120)	714	23	0,616	18 (2,5%)	2	16	0,52	0,042	-1,866	6	7
14.0130	Proteína similar a la nucleósido hidrolasa (140)	642	14	0,400	17 (2,6%)	0	17	0,60	0,114	-1,662	2	3
31.0280	Proteína hipotética conservada (310)	810	28	0,849	15 (1,8%)	0	15	0,58	0,245	-1,047	7	51
31.2610	Subunidad grande de la ARN polimerasa II (312)	486	10	0,338	8 (1,6%)	0	8	0,60	0,022	-1,384	4	10
Concatenada		4677	147	0,523	120	5	120	0,58	0,091	-1,720	37	80

h: Número de haplotipos;

Hd; Diversidad haplotípica;

S: Sitios polimórficos;

G+C: contenido nucleotídico

SNPs: Polimorfismos de nucleótido único;

SIP: Sitios informativos parsimoniosos;

d_N/ d_S: Tasa de sustitución de nucleótidos no sinónimos (dN) por sinónimos (dS);

SH: Sitios heterocigotos

*Los porcentajes son relativos a la longitud de la secuencia en cada gen

3.2. Identificación de Alelos y asignación de genotipos (ST) por marcador

La asignación de alelos diferentes se realizó mediante la comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos del GenBank utilizando el programa *MLSTest* (Tomasini *et al.*, 2013). El primer análisis consistió en asignar un número de alelo por cada secuencia diferente en cada uno de los genes analizados.

Todos los loci estudiados fueron polimórficos, y el número de alelos por locus vario significativamente con respecto al marcador, las cepas estudiadas presentaban entre 14 (31.2610) y 40 (31.0280) diferentes genotipos (ST), con una media de 26 alelos por marcador (Tabla 37). De los cuales 6 (31.2610) a 28 (03.0980) estuvieron representados por una única cepa. El mayor porcentaje (73%) de genotipos únicos lo obtuvo el loci 03.0980, mientras que el 12.00010 tuvo el valor más bajo (32%). En contraste, el porcentaje de secuencias compartidas (genotipos, ST) fue menor y varió de 2 a 20 (04.0580 y 31.0280, respectivamente) (Tabla 37).

Tabla 37. Variabilidad alélica por locus estudiado.

Locus	No. Total de Alelos por locus	No. Alelos ST (%)*	
		ST únicos	ST común
03.0980	38	28 (74%)	10 (26%)
04.0580	17	15 (88%)	2 (31%)
10.0560	32	22 (69%)	10 (31%)
12.0010	25	8 (32%)	17 (68%)
14.0130	19	8 (42%)	11 (58%)
31.0280	40	20 (50%)	20 (20%)
31.2610	14	6 (43%)	8 (57%)
Concatenado	175	107 (58%)	78 (42%)

ST: Secuencias tipo o genotipos por marcador, basadas en el número de Alelos

*Los porcentajes son relativos al número total de alelos presentes en cada gen

En algunos casos, la distribución de los genotipos fue específica en determinadas regiones geográficas, mientras algunos genotipos estuvieron ampliamente distribuidos.

En **03.0980**, el alelo con mayor prevalencia en la población fue el ST1-030 (305/385 aislados) presente en todos los países excepto en Sudán. Diez de los 38 tipos de genotipos encontrados estuvieron representados entre 2 y 13 cepas, mientras que el 73% fueron secuencias únicas (Tabla

36). De estas la mayoría provenía de casos de LCan o de casos de leishmaniasis humana asociados al brote de la CAM.

En **04.0580**, de los 17 tipos de secuencia encontradas, solo 2 estaban presentes en más de dos aislados, la primera y más frecuente la ST1-040 en 368 de 385 muestras, todas ellas de diferentes países excepto Sudán. La segunda ST2-040 presente en tan solo dos aislados de Sudán. Las 15 secuencias restantes (88; 23%) fueron secuencias únicas (Tabla 36).

En **10.0560**, se detectaron 32 secuencias diferentes, de las cuales ST1-100 fue la más frecuente (308/385 cepas), presente en todos Eurasia y África. Las restantes secuencias mostraron por lo general una agrupación geográfica específica y más exclusiva de la región mediterránea: ST6-100 (18/385 cepas) y ST7-100 (9/385 cepas) estaban presentes únicamente en cepas de Portugal, Italia, Grecia, Argelia, Sudán y España, mientras que la ST10-100 (4/385) solo fue encontrada en aislados de Marruecos, Túnez y Malta. El resto de STs estaban representadas por 2 a 11 aislados. El 67% de las cepas analizadas con este marcador fueron secuencias únicas (Tabla 36).

En **12.0010**, encontramos 25 secuencias tipo diferentes, siendo mayoritario el genotipo ST1-120 (80%, 310/385 cepas, no presente en cepas de Sudán), seguido del ST10-120 con 18 cepas, todas de España. Los restantes 15 haplotipos estaban representados por 2 a 18 cepas. Del análisis por locus individual, 12.0010 fue el marcador con menor número de secuencias únicas, solo el 32% (Tabla 36).

En **14.0130** encontramos 19 genotipos diferentes. Siendo el más frecuente ST1-140, presente en 329/385 cepas, y ausente en las cepas de Sudán. 14.0130 parece ser un marcador que presenta secuencias específicas para determinadas regiones geográficas, como es el caso de los genotipos ST3-140 (6 cepas) presente en Italia, Grecia, Túnez, ST4-140 (2 cepas) presente exclusivamente en cepas italianas y ST5-140 (7 cepas) en Marruecos y Sudán. La mayoría de los demás genotipos fueron exclusivos de aislados obtenidos de perros en España. Las 8 secuencias restantes (42,1%) fueron secuencias únicas (Tabla 36).

En **31.0280**, encontramos 40 tipos de secuencias, reflejando el gran número de sitios heterocigotos que presenta este marcador (51/385 cepas). El más común ST1-310 estaba presente en 240 cepas, seguido del genotipo ST2-310 (29/385), común entre países del Mediterráneo (España, Francia, Italia, Malta, Argelia), seguido de ST17-310 y ST16-310, encontrados exclusivamente en España, con 28 y 15 cepas, respectivamente (Tabla 36).

En **31.2610**, el marcador más conservado, hemos encontrado 14 tipos de secuencia. De las cuales ST1-312 estaba representado por 350/385 cepas, seguido de ST9-312 (presente en 9 cepas españolas), y del ST2-312 (presente en 6 cepas de origen francés y sudanés). Los restantes STs

estaban representados por 2 a 4 cepas. Las secuencias únicas en este marcador constituyeron el 42,8% de la muestra (Tabla 36).

3.3. Análisis de genotipos LST generados a partir del sistema de multilocus (MLSA)

A partir del alineamiento múltiple de la secuencia concatenada de los 7 marcadores, y utilizando el programa MLSTest, se definieron los tipos de secuencia o genotipo (LST) de cada una de las 385 cepas en base a la combinación de alelos presentes en cada una de ellas. La nomenclatura utilizada para la identificación de los diferentes genotipos fue un prefijo LST (*Leishmania Sequence Type*, LST) seguido de un número asignado a cada genotipo de forma consecutiva (LST01-LST175). El análisis permitió identificar 175 genotipos diferentes, de los cuales 150 eran únicos y 25 compartidos entre 2 o más cepas. En la siguiente tabla se muestran los perfiles alélicos obtenidos para las cepas analizadas, así como el LST que le corresponde a cada una. También se señala el número de cepas que presentan el mismo LST (Tabla 39).

Los genotipos (LSTs) 38, 44, 48, 49,52, 57, 61, 68, 78, 129 y 157 presentaron dos cepas con idéntico tipo de secuencia. Los LSTs 08, 51, 70, 97, 154, 167, 170, 172 estuvieron representados por entre 3 a 5 cepas. Y finalmente los genotipos mayormente representados agrupaban de 6-14 cepas: 2, 65, 158 y 166. Excepcionalmente el genotipo LST01 fue el más común (143/385 cepas) (Tabla 39), resultando el más frecuente en la cuenca mediterránea, y observándose en 21 de los 23 países de los incluidos en este estudio (excepto en Malta y Sudán), como también en diferentes hospedadores. En España, este genotipo fue muestreado 99 veces (46,2%) en 6 comunidades autónomas. Sin embargo, llama la atención que siendo el genotipo más común no se encontrara ni en el oeste ni en el norte de la Península Ibérica.

El segundo genotipo predominante fue el LST02 (n=14), compuesto por cepas de España (parte central de la Península) y de Francia. Este genotipo fue compartido entre humanos y flebotomos y se encontró mayoritariamente en zimodemas distintos a MON-1.

El siguiente genotipo más común fue el genotipo LST65, observado únicamente en 9 cepas aisladas de humanos y perros de Madrid entre 1991-2003 y asociado en su mayoría con el genotipo MON-24.

Sobre la base de nuestros resultados, no existe evidencia alguna entre la relación del fenotipo y el genotipo. Distintos zimodemas fueron encontrados en un genotipo y viceversa, varios genotipos fueron encontrados en un mismo zimodema. Algunos genotipos fueron específicos de

hospedador, mientras que otros eran compartidos por uno o más hospedadores distintos (humanos, perros y flebótomos). En el anexo 4 se encuentran detallados los resultados de tipado molecular mediante MLSA para el total de la muestra ($n= 385$).

Tabla 38. Perfiles alélicos obtenidos en las 385 cepas de *L. infantum* analizadas. La tabla incluye una cepa por genotipo LST.

Cepa de referencia	Alelos en cada locus							Genotipo LST	No. cepas
	Alelo 030	Alelo 040	Alelo 100	Alelo 120	Alelo 140	Alelo 310	Alelo 312		
L0075_FR	1	1	1	1	1	1	1	1	143
L0356_FR	1	1	1	1	1	2	1	2	14
L3141_FR	1	1	2	1	1	1	1	3	1
L3538_FR	1	1	1	2	2	3	2	4	1
L3588_ES	1	1	3	1	1	1	1	5	5
L0935_ES	2	1	1	1	1	1	1	6	1
L1560_ES	1	1	4	1	1	2	1	7	1
L2894_ES	1	1	1	1	1	4	1	8	3
L4223_ES	1	1	5	1	1	5	1	9	1
L4227_ES	1	1	5	1	1	2	1	10	1
L1764_PT	1	1	6	3	1	1	1	11	1
L3976_PT	1	1	7	1	1	1	1	12	1
L1733_IT	1	1	6	1	3	6	1	13	1
L2180_IT	1	1	6	1	3	2	1	14	1
L2481_IT	1	1	8	1	4	1	1	15	1
L2793_IT	1	1	6	1	3	5	1	16	1
L2794_IT	1	1	7	1	1	7	1	17	1
L2795_IT	3	1	9	4	4	8	1	18	1
L3437_IT	4	1	1	5	1	1	1	19	1
L1043_MT	1	1	10	1	1	2	1	20	1
L0659_GR	1	1	7	1	3	4	1	21	1
L4616_MA	1	1	10	1	1	1	1	22	1
L2455_MA	1	1	10	2	5	9	1	23	1
L0417_AR	1	1	1	6	6	10	1	24	1
L0425_AR	1	1	7	1	1	11	1	25	1
L2506_AR	5	1	6	1	1	2	1	26	1
L2884_AR	1	1	11	1	1	2	1	27	1
L3968_TN	1	1	7	1	3	12	1	28	1
L4392_TN	1	1	10	2	3	9	1	29	1
L0494_SD	1	1	1	2	5	13	2	30	1
L0890_SD	6	1	7	2	5	13	2	31	1
L1153_SD	1	1	6	2	5	14	2	32	1
L1154_SD	7	1	6	2	5	14	3	33	1
L3941_SD	4	1	7	5	5	15	2	34	1
L3988_SD	4	2	7	5	5	15	2	35	1
IK37	1	3	1	1	1	1	1	36	1
IK43	1	4	1	1	1	1	1	37	1
IK44	1	1	1	1	7	1	1	38	2
IK46	1	1	12	7	1	16	1	39	1
IK50	8	1	1	1	8	1	1	40	1
IK51	9	1	13	1	1	16	1	41	1
IK52	10	1	14	1	1	1	1	42	1
IK54	11	1	1	8	1	16	4	43	1
IK58	1	1	1	9	1	1	1	44	2
IK60	1	5	1	1	1	1	1	45	1

Tabla 38. Continuación. Perfiles alélicos obtenidos en las 385 cepas de *L. infantum* analizadas. La tabla incluye una cepa por genotipo LST.

Cepa de referencia	Alelos en cada locus							Genotipo LST	No. cepas
	Alelo 030	Alelo 040	Alelo 100	Alelo 120	Alelo 140	Alelo 310	Alelo 312		
IK61	8	1	1	10	1	1	1	46	1
IK63	1	1	15	1	1	1	1	47	1
IK65	8	1	1	1	1	1	1	48	2
IK64	1	1	1	10	1	17	1	49	2
IK70	8	1	1	11	1	1	5	50	1
IK73	1	1	1	10	1	16	1	51	5
IK74	1	1	1	1	1	18	1	52	2
IK77	8	1	16	1	1	16	1	53	1
IK82	1	1	17	1	1	16	1	54	1
IK94	1	1	1	10	1	1	6	55	1
IK96	1	6	1	1	1	1	1	56	1
IK97	1	1	1	12	1	1	1	57	2
IK98	1	1	18	10	1	1	1	58	1
IK104	1	1	19	10	1	16	1	59	1
IK107	1	1	1	11	1	1	1	60	1
IK113	1	1	1	10	1	1	1	61	2
IK115	1	1	20	10	1	16	1	62	1
IK118	1	1	1	1	1	16	1	63	1
IK124	1	7	1	10	1	1	1	64	1
IK125	12	1	1	1	1	1	1	65	9
IK131	1	1	6	10	1	1	1	66	1
IK134	1	1	1	1	1	19	1	67	1
IK137	1	1	3	1	1	2	1	68	2
IK139	1	1	3	1	1	20	1	69	1
IK140	1	1	6	1	1	1	1	70	5
IK143	1	1	16	10	1	1	1	71	1
IK151	1	1	6	1	1	20	1	72	1
IK160	13	1	1	1	1	21	1	73	1
IK168	1	1	6	1	1	2	1	74	1
IK170	1	8	1	1	1	1	1	75	1
IK172	14	9	1	1	1	1	1	76	1
IK173	1	1	21	1	1	1	1	77	1
IK178	1	1	1	1	1	1	7	78	2
IK185	1	1	3	10	1	1	5	79	1
IK186	15	1	1	1	1	2	5	80	1
IK190	16	1	1	1	1	2	1	81	1
IK193	12	1	1	1	1	22	1	82	1
IK204	1	1	22	1	1	1	7	83	1
IK206	1	1	23	1	1	2	1	84	1
IK209	1	1	24	1	1	16	1	85	1
IK214	1	1	1	1	1	1	8	86	1
IK231	17	1	3	1	1	1	1	87	1
IK258	18	1	1	1	1	16	1	88	1
IK263	1	1	25	7	1	1	9	89	1
IK273	12	1	1	1	1	2	1	90	1
IK416	19	1	1	9	1	23	10	91	1
IK417	8	1	1	1	1	24	1	92	1
IK418	1	1	4	13	1	25	1	93	1
IK419	20	10	1	13	1	2	11	94	1
IK420	20	1	1	1	1	23	1	95	1
IK421	1	1	1	13	1	23	1	96	1
IK422	1	1	1	1	1	23	1	97	4

Tabla 38. Continuación. Perfiles alélicos obtenidos en las 385 cepas de *L. infantum* analizadas. La tabla incluye una cepa por genotipo LST.

Cepa de referencia	Alelos en cada locus							Genotipo LST	No. cepas
	Alelo 030	Alelo 040	Alelo 100	Alelo 120	Alelo 140	Alelo 310	Alelo 312		
IK424	21	1	1	1	9	1	1	98	1
IK425	22	1	26	1	1	23	1	99	1
IK426	1	1	1	1	1	23	12	100	1
IK428	8	1	1	14	1	18	1	101	1
IK431	1	1	3	1	1	26	1	102	1
IK433	1	1	1	9	1	27	1	103	1
IK434	1	1	1	9	1	28	1	104	1
IK435	1	1	27	14	1	17	1	105	1
IK438	1	1	1	1	1	29	1	106	1
IK439	23	1	1	1	1	17	1	107	1
IK440	24	1	1	1	1	29	13	108	1
IK441	25	1	1	15	1	30	1	109	1
IK442	26	1	6	16	1	31	13	110	1
IK443	27	1	28	16	1	17	1	111	1
IK444	28	1	28	17	1	11	9	112	1
IK445	29	1	1	18	1	17	9	113	1
IK446	1	1	1	18	1	1	9	114	1
IK447	27	1	1	17	1	17	14	115	1
IK448	1	1	1	19	1	32	1	116	1
IK449	8	1	1	17	1	17	1	117	1
IK450	8	1	1	20	1	17	1	118	1
IK451	8	1	1	14	1	17	1	119	1
IK452	8	1	1	21	1	17	1	120	1
IK454	1	1	1	15	1	1	1	121	1
IK455	1	11	7	17	1	1	1	122	1
IK456	1	1	1	19	1	17	1	123	1
IK457	30	1	1	1	1	33	1	124	1
IK458	9	1	1	22	1	26	1	125	1
IK459	9	1	1	22	1	17	1	126	1
IK460	19	1	1	17	1	1	1	127	1
IK461	8	12	1	1	1	26	9	128	1
IK462	1	1	1	1	1	26	1	129	2
IK463	31	1	1	14	1	33	1	130	1
IK464	1	1	1	1	1	34	12	131	1
IK465	1	1	1	23	1	1	1	132	1
IK466	32	1	1	19	1	2	1	133	1
IK467	33	1	1	1	1	35	1	134	1
IK468	32	1	6	1	1	26	1	135	1
IK469	32	1	1	1	1	26	1	136	1
IK472	32	1	6	1	1	36	9	137	1
IK473	32	1	28	1	1	26	1	138	1
IK474	9	1	1	1	1	7	1	139	1
IK475	32	1	29	1	1	1	1	140	1
IK477	9	1	1	1	1	1	1	141	1
IK478	9	1	1	14	1	1	1	142	1
IK479	33	1	1	1	1	37	1	143	1
IK480	33	13	1	14	1	26	1	144	1
IK482	32	1	1	1	1	27	1	145	1
IK483	9	1	1	1	1	38	1	146	1
IK484	9	11	30	1	1	26	1	147	1
IK485	34	1	31	24	1	1	1	148	1
IK486	35	14	32	24	1	1	1	149	1

Tabla 38. Continuación. Perfiles alélicos obtenidos en las 385 cepas de *L. infantum* analizadas. La tabla incluye una cepa por genotipo LST.

Cepa de referencia	Alelos en cada locus							Genotipo LST	No. cepas
	Alelo 030	Alelo 040	Alelo 100	Alelo 120	Alelo 140	Alelo 310	Alelo 312		
IK487	32	1	30	24	1	39	1	150	1
CAN01	1	1	30	1	10	17	1	151	1
CAN02	1	1	30	1	10	1	1	152	1
CAN03	1	1	1	1	11	17	1	153	1
CAN04	1	1	1	1	12	17	1	154	3
CAN06	1	1	1	1	13	17	1	155	1
CAN07	1	1	1	1	12	22	1	156	1
CAN08	1	1	1	1	14	1	1	157	2
CAN10	1	1	1	1	15	1	1	158	5
CAN11	1	1	1	1	16	1	10	159	1
CAN12	1	15	1	1	14	17	1	160	1
CAN13	1	1	1	1	17	17	1	161	1
CAN15	1	1	1	1	13	1	1	162	1
CAN16	1	1	1	1	18	1	1	163	1
CAN17	1	1	1	1	19	22	10	164	1
CAN21	1	1	1	1	19	1	10	165	1
CAN22	1	1	1	1	19	1	1	166	8
CAN24	1	1	1	1	19	17	1	167	3
CAN28	1	16	1	1	19	17	1	168	1
CAN34	1	17	1	1	19	1	1	169	1
CAN37	1	1	1	1	1	17	1	170	3
CAN39	1	1	1	1	1	7	1	171	1
CAN40	1	1	1	1	1	1	9	172	3
FLE2	36	1	1	25	1	11	1	173	1
FLE4	37	1	1	1	1	40	1	174	1
FLE8	38	1	1	1	1	1	1	175	1

3.4. Análisis filogenético

A partir de las secuencias obtenidas del concantenado de los 7 loci analizados se generaron representaciones gráficas con ayuda de programas informáticos *PHYLIP* y *MLSTest*. La relación existente entre cepas con distintos perfiles alélicos o LSTs se mostró generando un dendrograma a partir de una matriz de no coincidencias alélicas entre parejas LSTs, y aplicando el método de NJ (*Neighbor Joining*) basada en distancias, suponiendo que la velocidad de sustitución nucleotídica es la misma para los 4 nucleótidos A, T, C y G. El análisis filogenético identificó 4 grupos genéticos (clados) principales entre las cepas de *L. infantum* de Eurasia (incluyendo las españolas) y África, apoyados por valores de *bootstrap* entre 68% a 100% (Figura 44). Estos cuatro grupos fueron también confirmados mediante el análisis de Máxima Verosimilitud (ML), que generó un árbol con una topología muy similar. La congruencia entre los dos árboles fue casi absoluta y se evaluó mediante la prueba SH. Al probarse en 100 árboles al azar, la diferencia de probabilidad entre el árbol NJ y el ML fue insignificante ($-\ln L = 51.25$ p < 0,05), lo que indica que los árboles ML y NJ fueron significativamente congruentes. Para mostrar los

resultados y discutir este apartado se ha escogido el método de NJ por ser el más usado para este tipo de análisis en otros estudios (Figura 44).

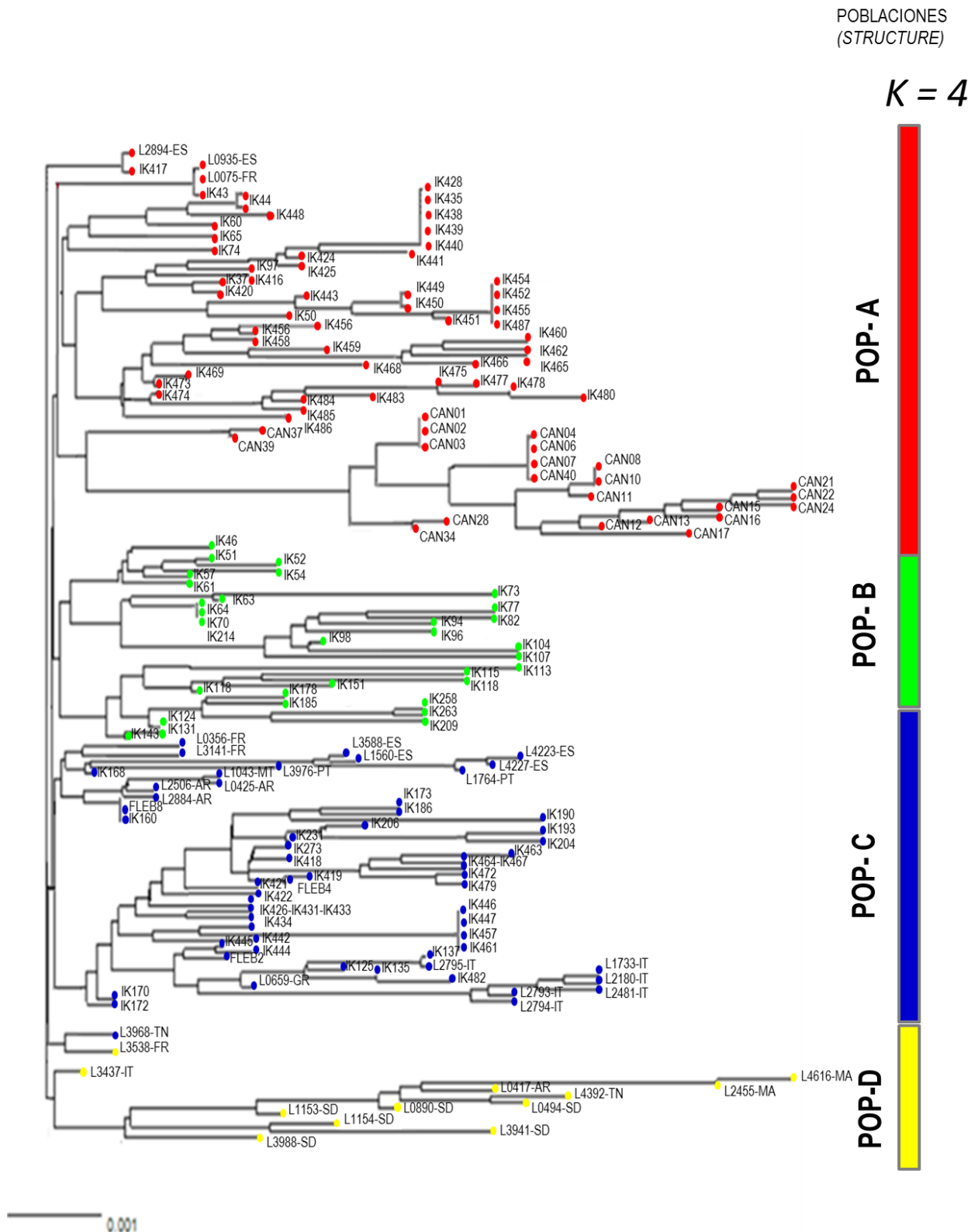


Figura 44. Árbol filogenético obtenido mediante *Neighbor-joinig* inferido a partir de las distancias genéticas entre las 175 secuencias tipo encontrados en *L. infantum*. Se observan cuatro agrupaciones representadas por un grupo de 72 LSTs en la población POP-A (rojo), 30 LSTs en POP-B (verde), 61 LSTs en POP-C (azul) y 12 LSTs en POP-D (amarillo). A la derecha se indican las poblaciones (K) obtenidas con *STRUCTURE*.

3.5. Determinación de la estructura de poblaciones mediante análisis bayesiano

El análisis bayesiano realizado con el programa *STRUCTURE* indicó que el número de clústeres que presenta el mayor valor medio para el Ln de máxima verosimilitud y menor desvío estándar fue $K=4$ (Figura 45-A). Sobre la base de este análisis se definen 4 grupos genéticos (poblaciones-POP-A, B, C y D), compatibles con los definidos previamente mediante análisis filogenético usando tanto el método de NJ como ML.

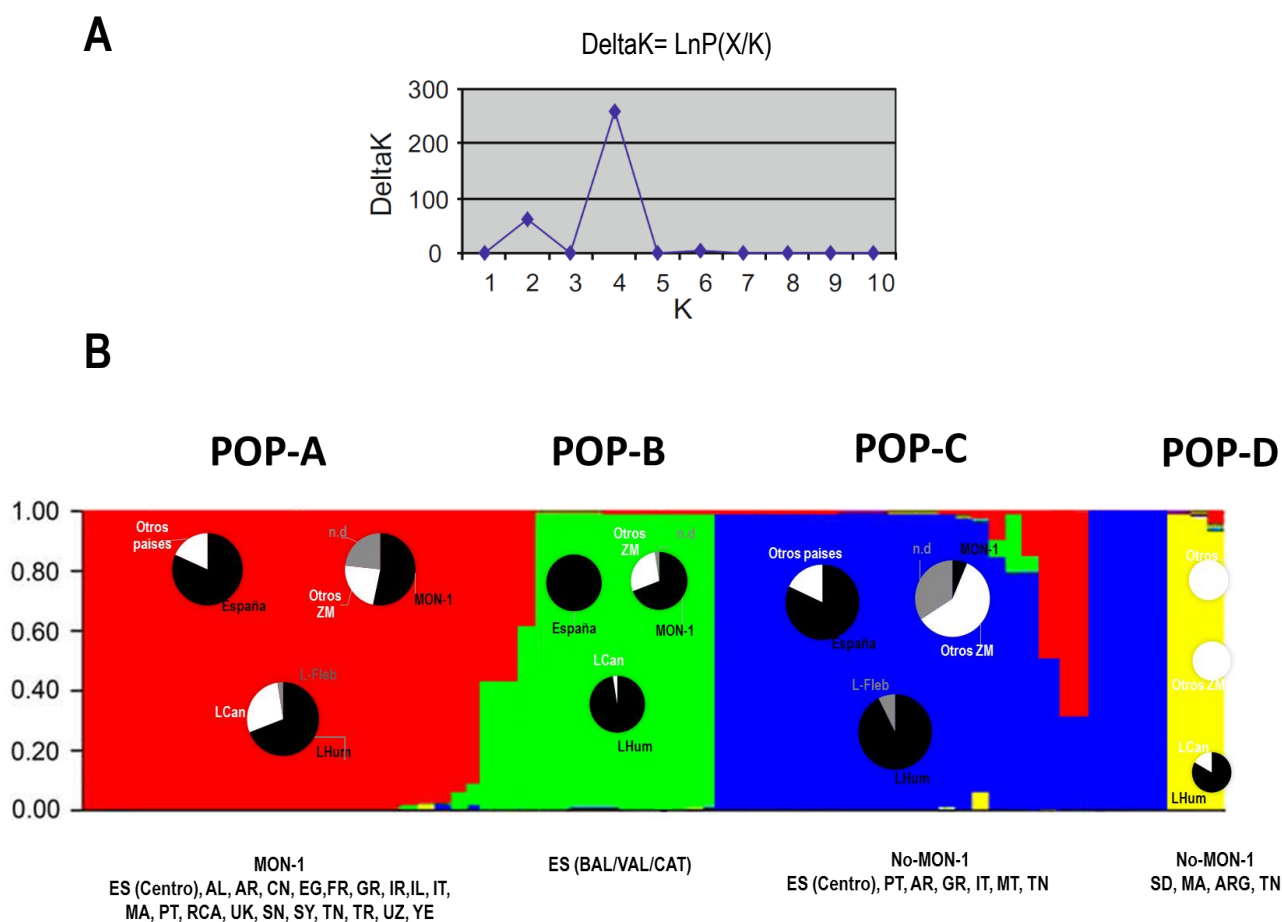


Figura 45. Estructura de poblaciones de las 385 cepas de *L. infantum* analizadas, como se deduce por el software de *STRUCTURE*. La estructura se basa en los datos de los perfiles alélicos encontrados por el análisis de los 7 marcadores multilocus (MLSA). (A) Representa la estimación del valor de K. El pico principal en $K=4$, indica el número más probable de poblaciones en el conjunto de cepas totales. (B) Segmentos verticales (*barplots*) donde $K = 4$ es el número de poblaciones asumidas. Cada color representa una población, y la longitud del segmento coloreado muestra la proporción estimada de miembros de esa población. En cada población se indican los países en donde están presentes estas poblaciones. Los gráficos circulares incluidos en cada población representan el porcentaje de cepas en función del origen geográfico (ES: España vs. Otros países). Además, se incluye un gráfico circular para representar el porcentaje de cepas MON-1 y No-MON-1 (38 zimodemas diferentes) y otro para el tipo de hospedador (LHum, leishmaniasis humana; LCan, leishmaniasis canina, L-Fleb: cepas de *Leishmania* obtenidas del flebótomo).

3.6. Poblaciones identificadas mediante el análisis filogenético (NJ y ML), y análisis bayesiano.

Los análisis descritos anteriormente revelaron 4 poblaciones de *L. infantum* en las regiones de Euroasia y África:

La primera población, **POP-A**, es la población que abarcó el mayor número de la muestra en total (63%), y la constituyen las 241 cepas distintas en las cuales se observaron 71 LSTs. La POP-A presentó un predominio del zimodema MON-1 (53%) y solo el 23% de la muestra la constituían otros 23 zimodemas representados en minoría. En POP-A se agrupaban 197 muestras de España (82% de la muestra). Cabe resaltar que el 60% de las cepas implicadas en el brote de la CAM (47/79) se encuentran en este grupo, observándose en la mayoría de ellas un tipo de secuencia para cada uno de los aislados (tipos diferentes de LST) (Anexo 4). Por otra parte, en esta población se encuentra un subclúster de aislados de LCan (indicados en el árbol como CAN) aislados durante el 2001-2003 en Madrid. Las restantes 44 secuencias (18%) eran representativas de la mayoría (20/23) de los países incluidos (excepto Sudán y Malta), es decir, fue la población más popular a nivel global.

La población **POP-B** se compone de 38 cepas, las cuales se agrupan en 30 LST. Es un grupo exclusivo de España, principalmente de la región de Levante e Islas Baleares, y corresponde a aislados tanto de humanos como de perros. No incluye aislados del brote de la CAM, pero incluye una gran variedad de zimodemas: MON-1, MON-24, MON-29, MON-34, MON-183 y MON-284.

La población **POP-C** es más heterogénea y está compuesta por genotipos diferentes de otros países y zimodemas, todos ellos No-MON-1. Incluye 94 cepas de países de la cuenca mediterránea: Argelia (3), Francia (3), Grecia (1), Italia (6), Malta (1), Portugal (2); Túnez (1) y 77 cepas españolas. De estas últimas, 25 pertenecen a los casos del brote de la CAM y 6 son de flebotomos capturados en ese foco durante la temporada del 2012. El 40% de las cepas del brote se ubican en esta población.

La cuarta población, **POP-D**, es el grupo filogenéticamente más alejado con respecto a las demás poblaciones, independientemente del análisis realizado. Es un grupo compuesto por pocas cepas (n=12) procedentes de Sudán (n=6), Marruecos (n=2), Argelia (n=1), Túnez (n=1), Italia (n=1) y Francia (n=1).

Tabla 39. Resumen de las características más destacadas por tipo de población de *L. infantum*, genotipos MLSA, distribución geográfica, perfil isoenzimático y hospedador.

Población	No. Cepas	Genotipos MLSA			Distribución geográfica		Zimodemas		Hospedador
		LST común	LST única	Totales ^a	España	Otros	MON-1	No MON-1	
POP-A	241 (62%)	14 (19%)	58 (81%)	72 (41%)	197 (81%)	44 (18%)	129 (53%)	56 (23%)	Humano (167)
									Perro (68)
									Flebótomo (6)
POP-B	38 (10%)	5 (13%)	25 (66%)	30 (17%)	38 (35%)	0	26 (69%)	11 (31%)	Humano (38)
									Perro (1)
POP-C	94 (25%)	6 (6%)	55 (56%)	61 (35%)	77 (82%)	17 (18%)	6 (6%)	56 (60%)	Humano (87)
									Flebótomo (7)
POP-D	12 (3%)	0	12 (100%)	12 (7%)	0	12 (100%)	0	12 (100%)	Humano (10)
									Perro (2)
Totales	385	25	150	175	312	73	161	135	385

4. DISCUSIÓN

El estudio de 385 cepas de *L. infantum* mediante MLSA ha mostrado una elevada diversidad genética en esta especie, de la que hemos incluido cepas de 23 países distintos de Eurasia y África. El estudio de la diversidad alélica de los 7 genes incluidos en el protocolo de MLSA ha permitido identificar 175 genotipos (o tipos de secuencia de *Leishmania*, LST) distintos en la muestra estudiada. La capacidad de resolución de MLSA ha mostrado ser superior a la aproximación tradicional para el tipado de *Leishmania*, MLEE, y también a la de los marcadores moleculares ITS y *k26*.

Entre los 175 genotipos identificados, no se observó ninguna asociación entre genotipo y hospedador o forma clínica en los casos de leishmaniasis humana. Sí que observamos que 150 genotipos eran específicos de cepa; indicando el potencial de esta metodología en el seguimiento de cepas en el marco de un sistema de vigilancia, permitiendo determinar el origen y propagación de *L. infantum*. Como ejemplo tenemos los genotipos LST65, LST02 y LST01, específicos de Madrid, Francia y España, y la región mediterránea respectivamente.

De manera más global observamos que, tanto los análisis filogenéticos (mediante *Neighbor-Joining* y Máxima Verosimilitud) como el análisis bayesiano de estructura de poblaciones, definen de manera consistente cuatro poblaciones principales, en las que se encuentran subclústeres que agrupan cepas estrechamente relacionadas entre sí. La población POP-A está compuesta en su mayoría (82%) por cepas españolas, incluyendo el 60% de las cepas del brote de la CAM. La población POP-B está compuesta en su totalidad por cepas de la región oriental de España (incluyendo las Islas Baleares). La población POP-C, incluye cepas restringidas a la región mediterránea, entre ellas el 40% de las cepas asociadas al brote de la CAM. La cuarta población, POP-D, constituye un grupo más alejado filogenéticamente, que incluye en su mayoría cepas de Sudán.

En el Capítulo 1 el empleo de los marcadores ITS y *k26* mostró que las cepas de *L. infantum* asociadas al brote de la CAM se distribuyen en distintos genotipos. El análisis de MLSA muestra un resultado similar, con los distintos LSTs formando parte de dos poblaciones principales, POP-A y POP-C. De manera que se refuerza la idea de que la causa del brote pudiera ser la propagación del ciclo silvestre mantenido entre conejos y liebres, y con su propio grado de variabilidad entre los parásitos.

Tal y como se muestra en la Figura 45, existen alelos compartidos entre las distintas poblaciones, principalmente entre POP-A, POP-B y POP-C. La menor tasa de alelos compartidos en POP-D

refleja su aislamiento, mayor distancia filogenética, de las otras 3 poblaciones, hallazgo por otra parte razonable, dado el aislamiento geográfico.

La presencia de alelos compartidos entre las distintas poblaciones parece indicar la existencia de intercambio genético entre las cepas de *L. infantum*, el cual podría actuar como la fuerza evolutiva responsable de la plasticidad que permite a *L. infantum* adaptarse a distintos reservorios y ciclos de transmisión.

Leishmania se considera actualmente como organismo diploide, aunque la aparición de cromosomas aneuploides podría ser un evento frecuente (Rogers *et al.*, 2011). En el presente estudio, se detectaron sitios heterocigóticos en todos los loci analizados, lo que confirma que el genoma de *Leishmania* es al menos parcialmente diploide. En los 4.677 pb analizados, los sitios heterocigóticos se encontraron en 20% de las cepas seleccionadas, un considerable número a tener en cuenta para el análisis de otros marcadores.

En parte de la muestra estudiada no podemos establecer de manera precisa la relación entre la distancia geográfica y la distancia genética, al ser este un asunto complejo en el caso de un parásito que puede utilizar distintos hospedadores y ser transmitido por distintas especies de flebótomos. En principio la distribución de los distintos LST estaría relacionado con la distribución geográfica de los reservorios y vectores. Sin embargo, la capacidad del parásito (la plasticidad mencionada anteriormente) para pasar de un ciclo de transmisión a otro puede modificar esta relación y explicar la propagación inesperada de alguna de las cepas (Myskova *et al.*, 2007). Tampoco podemos descartar la posibilidad de que algunas de las cepas aisladas en Europa (en la colección de datos generados por El Baidouri *et al.*, 2013) fuesen casos importados. Las distintas cepas de *L. infantum* podrían evolucionar mediante divergencia progresiva, acumulando mutaciones y adaptándose a distintos ciclos de transmisión. De manera simultánea, la dispersión de algunos genotipos (LSTs) en áreas geográficas amplias también indica un proceso activo, probablemente ligado a la movilidad de algunos reservorios (por ejemplo, el desplazamiento normal de las poblaciones o los casos importados) y a la capacidad de los parásitos de adaptarse a distintas especies de reservorio.

Ha de tenerse en cuenta, que diferentes mecanismos evolutivos como la migración, la selección y la deriva genética juegan un papel fundamental en la distribución genética en las poblaciones naturales, pero la reproducción es el proceso biológico básico que influye en la estructura genética de la población. La identificación del sistema reproductivo es aún más esencial, ya que gobierna la distribución alélica y genética en las poblaciones naturales y condiciona la estabilidad de los genotipos en el espacio y el tiempo (Tibayrenc, 1995). Y todo ello, tiene importantes consecuencias desde el punto de vista epidemiológico y clínico (tipificación de cepas, patogenicidad, especificidad de los vectores y susceptibilidad a fármacos y vacunas).

Para microorganismos patógenos como algunas bacterias y protozoos parásitos, la dilucidación de la estructura de la población proporciona una visión única de los problemas cruciales de salud pública, incluyendo la aparición y persistencia de variantes que escapan a la inmunidad o la aparición de resistencia a los antibióticos (Tibayrenc, 1995, 1996). En consecuencia, parece innegable que el conocimiento del sistema reproductivo de *Leishmania* es esencial para explotar plenamente los datos epidemiológicos moleculares. No obstante, así como expone Prugnolle *et al.*, (2005), el estudio de la estructura genética de la población también es crucial para la comprensión de los procesos evolutivos. Además, para los microorganismos y en particular los parásitos, el análisis de la variación genética a diferentes niveles jerárquicos suele ser la única manera de investigar las características naturales de la población, como el flujo de genes y las estrategias de reproducción. Todo ello, en conjunto puede constituir una poderosa herramienta para investigar patrones epidemiológicos (Paterson & Viney, 2000).

El sistema de MLSA ha mostrado ser una aproximación robusta al tipado de *L. infantum*, su elevada resolución, junto con la simplicidad del método y la posibilidad de compartir los resultados hacen de este sistema una herramienta ideal para apoyar un sistema de vigilancia de leishmaniasis.

Capítulo 4.

Identificación molecular de los flebótomos de la región mediterránea mediante el análisis de la secuencia de ADN de los genes *cytb-nd1*

1. ANTECEDENTES

Los flebótomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) son vectores de numerosas enfermedades de importancia médica y veterinaria (Pigott *et al.*, 2014), como infecciones causadas por protozoos (*Leishmania*), bacterias (*Bartonella bacilliformis*) y virus (*Phlebovirus*, *Vesiculovirus* y *Orbivirus*) (Antoniou *et al.*, 2008; Depaquit *et al.*, 2010; Maroli *et al.*, 2013; Ready, 2013). (i) En la Cuenca Mediterránea diferentes especies de flebótomos son vectores de *Leishmania tropica*, *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*, los agentes causales de la leishmaniasis en esta área; (ii) en cuanto a las enfermedades virales transmitidas por flebótomos en esta región, encontramos las causadas por *Phlebovirus* (familia *Bunyaviridae*), como la fiebre causada por los virus Nápoles, Sicilia y Toscana, así como la meningitis causada por el virus Toscana.

Tanto la leishmaniasis como las enfermedades virales transmitidas por vectores representan un serio problema para la salud pública y son consideradas como infecciones re-emergentes en la región mediterránea. Por tanto, la vigilancia de los vectores debe ser uno de los pilares de las actividades dedicadas a la elaboración y aplicación de medidas de control eficaces contra estas enfermedades (Antoniou *et al.*, 2013; Charrel *et al.*, 2012; Ejov & Dagne, 2014; Franco *et al.*, n.d.; Maroli *et al.*, 2013; WHO, 2008).

Solo algunas especies de flebótomos han sido confirmadas como vectores de la leishmaniasis, por lo tanto, un aspecto importante en la vigilancia es la adecuada identificación de los especímenes obtenidos. Tradicionalmente la identificación de la especie de flebótomos se ha basado en el análisis morfológico de estructuras anatómicas tales como la faringe, espermatecas y cibario de las hembras, y los terminales de la genitalia de los machos (Killick-Kendrick *et al.*, 1991). Este enfoque requiere un alto grado de experiencia y es difícil cuando las muestras no se conservan adecuadamente.

Para facilitar esta tarea, se han propuesto diferentes métodos moleculares como herramienta complementaria para la identificación taxonómica de cada espécimen. La amplificación de una región de ADN que abarca parte de los genes mitocondriales *cytb* y *nd1* y la posterior digestión del producto de PCR con la endonucleasa *Ase I*, se ha propuesto como una metodología útil para la identificación rápida de los flebótomos más comunes en la región mediterránea (Latrofa *et al.*, 2012). Sin embargo, es importante tener en cuenta que dicho estudio se realizó en muestras recogidas de una zona geográfica muy delimitada de Italia (Basilicata). Más tarde, Bounamous *et al.*, (2014) no consiguieron distinguir algunas especies de flebótomos de Argelia utilizando esta metodología, a pesar de pertenecer de tratarse de especies pertenecientes a diferentes géneros (*Phlebotomus ariasi* y *Sergentomyia schwetzi*).

El presente estudio, tiene como objetivo evaluar si la metodología propuesta por Latrofa *et al.*, (2012) es útil para la identificación de especies de flebótomo en muestras con un origen geográfico más amplio, incluyendo España y otras zonas endémicas de la región mediterránea, donde las enfermedades transmitidas por flebótomos son endémicas y se requiere de la identificación entomológica como parte de las actividades de vigilancia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron dos enfoques diferentes para validar el protocolo de PCR-RFLP propuesto por Latrofa *et al.*, (2012). El primero de ellos, consistió en el uso de la técnica de biología molecular RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) usando la endonucleasa (*Ase I*), para conseguir los patrones de restricción presentes en distintas especies de flebótomos capturados en España (**Panel 1:** flebótomos de España ($N=155$), véase más adelante); el segundo método empleado fue un análisis *in-silico* de las secuencias de ADN de los especímenes del Panel 1 junto con 277 secuencias de ADN de 12 especies de flebótomos de la región mediterránea y/o países de Oriente Medio descargadas del Genbank (**Panel 2:** Secuencias de ADN del Genbank ($N=277$)).

2.1. Panel 1: Flebótomos capturados en España (N = 155)

Los ejemplares de este panel fueron capturados en diferentes sitios de la Península Ibérica e Islas Baleares entre junio y octubre de 2013, dentro de la temporada de actividad del flebótomo en España (entre mayo-octubre). Los especímenes fueron capturados usando trampas de luz CDC (John W. Hock, Company, Gainesville, FL) y se almacenaron en etanol al 70 % a -20 °C hasta su posterior análisis molecular, siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 3.1.3 de Materiales y Métodos. Los sitios de muestreo fueron seleccionados de acuerdo a los diferentes pisos bioclimáticos presentes en España como se indicó en el Apartado 3.1.1 de Materiales y Métodos (Figura 46).

Tanto los ejemplares machos como las hembras fueron identificados morfológicamente con base en las características de su genitalias. En las hembras, también se examinaron las armaduras bucales del cibario y la faringe. La porción distal del abdomen (entre los segmentos VI y VII) y la cabeza de las hembras fueron seccionadas y aclaradas en medio Mark André (Abbonnenc, 1972). Los especímenes fueron montados en portabjetos de vidrio en medio Hoyer (Upton, 1993) e identificadas a nivel de especie, conforme a las claves taxonómicas propuestas por Gil *et al.*,

(1989). Las piezas montadas de cada uno de los especímenes fueron guardadas como futuras referencias en la colección del Departamento de Sanidad Animal, Grupo Epicontrol carnívoros (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España). Una descripción detallada de lugares de muestreo, especies (*P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. papatasi*, y *S. minuta*), y número de especímenes incluidos en el Panel 1 se presentan en la Figura 46 y Tabla 40.

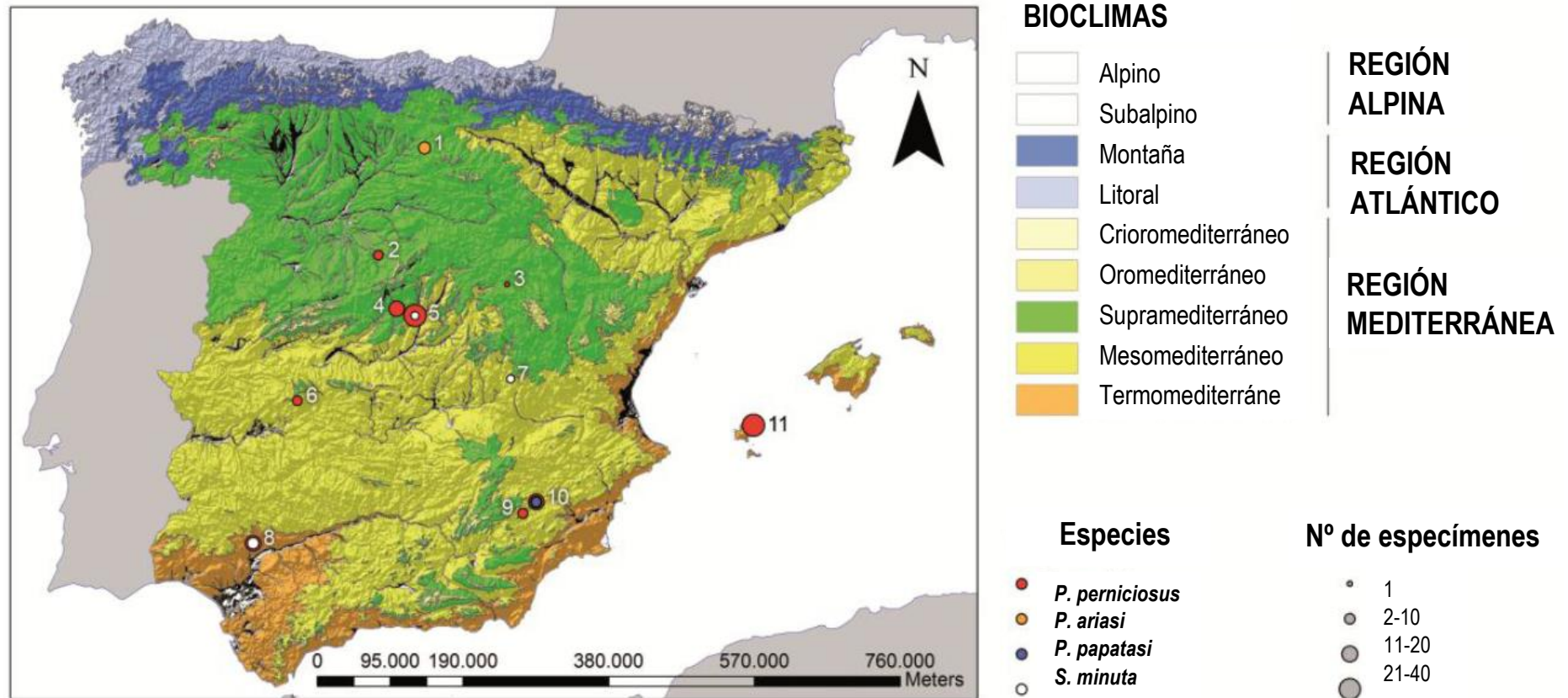


Figura 46. Sitios de muestreo geocodificados y número de flebotomos capturados de acuerdo a la zona bioclimática de España. Los números indican los lugares de muestreo: Agés (Burgos) (1), Escarabajosa de Cabezas (Segovia) (2), Zaorejas (Guadalajara) (3), Majadahonda (Madrid) (4), Vicálvaro (Madrid) (5), Cañamero (Cáceres) (6), Buenache de Alarcón (Cuenca) (7), Castilblanco de los Arroyos (Sevilla) (8), Archivel (Murcia) (9), Moratalla (Murcia) (10), and San Joan de Labritja (Ibiza) (11). Los círculos de colores indican las especies de flebotomos. El tamaño del círculo indica el número de ejemplares acorde a la escala que se muestra en la gráfica.

Tabla 40. Descripción de los sitios de muestreo, especies, y número de especímenes incluidos en el Panel 1 ($N=155$). Flebótomos capturados en España, entre junio y octubre de 2013.

Provincia	Localidad	Fecha de captura (d/m/a)	Coordenadas	Especie	Nº de especímenes (macho/hembra)
Burgos	Agés	15/08/2013	42.37 N 3.49 W	<i>P. ariasi</i>	12 (12/0)
Segovia	Escarabajosa de Cabezas	15/08/2013	41.10 N 4.20 W	<i>P. perniciosus</i>	7 (7/0)
Guadalajara	Zaorejas	06/07/2013	39.38 N 5.40 W	<i>P. perniciosus</i>	1 (1/0)
Madrid	Majadahonda	08/08/2013	40.48 N 3.91 W	<i>P. perniciosus</i>	18 (18/0)
Madrid	Vicálvaro	07/10/2013	40.40 N 3.62 W	<i>P. perniciosus</i>	21 (17/4)
Madrid	Vicálvaro	07/10/2013	40.40 N 3.62 W	<i>S. minuta</i>	1 (1/0)
Cuenca	Buenache de Alarcón	15/08/2013	39.65 N 2.16 W	<i>S. minuta</i>	1 (1/0)
Cáceres	Cañamero	03/08/2013	39.38 N 5.40 W	<i>P. perniciosus</i>	3 (1/2)
Murcia	Archivel	23/07/2013	38,07 N 2.00 W	<i>P. perniciosus</i>	8 (3/5)
Murcia	Moratalla	23/07/2013	39.02 N 1.49 E	<i>P. perniciosus</i>	17 (3/14)
Murcia	Moratalla	23/07/2013	39.02 N 1.49 E	<i>P. papatasi</i>	2 (2/0)
Murcia	Moratalla	23/07/2013	39.02 N 1.49 E	<i>S. minuta</i>	3 (3/0)
Sevilla	Castilblanco de los Arroyos	24/06/2013	37.69 N 6.00 W	<i>P. perniciosus</i>	11 (10/1)
Sevilla	Castilblanco de los Arroyos	24/06/2013	37.69 N 6.00 W	<i>S. minuta</i>	10 (10/0)
Ibiza	Sant Joan de Labritja	01/10/2013	39.02 N 1.49 E	<i>P. perniciosus</i>	40 (38/2)

2.2. Panel 2: Secuencias de ADN obtenidas del Genbank (N=277)

Con el fin de aumentar la muestra de nuestro estudio y completar el esquema de los flebótomos característicos de la región Mediterránea, más allá de los presentes en el Panel 1, se realizó una búsqueda en la base de datos del Genbank usando el algoritmo BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que usa por defecto el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). La búsqueda proporcionó un total de 277 secuencias de ADN correspondientes a 13 especies distintas de flebótomos (*P. ariasi*, *P. balcanicus*, *P. caucasicus*, *P. chabaudi*, *P. chadlii*, *P. longicuspis*, *P. neglectus*, *P. papatasi*, *P. perfiliewi*, *P. perniciosus*, *P. riouxi*, *P. sergenti* y *S. minuta*) las cuales contenían la secuencia de la región parcial del gen *cytb-nd1* que abarcan los cebadores PhleF y PhleR descritos por Latrofa *et al.* (2011).

Se realizó una segunda a través de PubMed (www.pubmed.gov) utilizando palabras clave como el taxón (*Phlebotomus*, *Sergentomyia*) o variantes del nombre del gen *cytb*, como *cyt b*, *cyt-b*, *cytochrome b*, *cytochrome-b*.

Las secuencias de ADN seleccionadas incluyen aquellas que se corresponden con especies de flebótomos endémicas en la Cuenca Mediterránea y Oriente Medio, así como otras regiones donde estas especies pudieran estar presentes. Los detalles de los especímenes incluidos en el Panel-2 se presentan en la Tabla 41. Los detalles relacionados con estas secuencias se presentan en el Anexo 5.

2.3. Obtención de ADN y PCR para la región *cytb-nd1* del Panel 1

El ADN genómico se extrajo de forma independiente a partir de cada espécimen del panel 1. Los flebótomos fueron triturados (fragmentos del torax y abdomen almacenados a -20 °C) y procesados con el kit comercial QIAamp® *DNA Mini Kit* (Qiagen, Alemania), según las indicaciones del fabricante descritas en el Apartado 4.1 de Materiales y Métodos. El ADN se eluyó en 50 µl de agua con calidad PCR y se almacenó a -20°C.

La amplificación del ADN mitocondrial que abarca la región de interés en los genes *cytb* y *nd1* se efectuó de acuerdo con el protocolo de Latrofa *et al.*, (2012), con algunas modificaciones como se describe en el Apartado 5.2.2 de Materiales y Métodos. Brevemente, se utilizaron dos microlitros de ADN en una reacción de PCR con volumen final de 25 µl, con el tampón de PCR 10X (que contiene de 2 mM de MgCl₂), 0,2 mM de cada dNTP, y 0,7 U de ADN polimerasa de *Thermus sp.* (Biotools, B&M Labs, S.A. Madrid, España), y 15 µM de cada oligonucleótido iniciador PhleF (5'-AAT AAA TTA GGA GGA GTA ATT GC-3') y PhleR (5'-GCC TCG AWT TCG WTT ATG ATA AAT T-3'). La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes

condiciones: desnaturalización inicial de 5 min a 94 ° C, 40 ciclos a 94 ° C durante 1 min, 52 ° C durante 1 min, y 72 ° C durante 1 min, y una extensión final a 72 ° C durante 10 min. Los productos de PCR- *cytb* se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñido con solución de tinción de ácidos nucleicos *Pronasafe* (CONDA, Madrid, España) y se visualizaron bajo luz UV (Apartado 6.1 de Materiales y Métodos).

2.4. Análisis de RFLP con *Ase I*

Los amplicones obtenidos se sometieron a una digestión con la endonucleasa *Ase I* (New England Biolabs® Inc) como describen Latrofa *et al.*, (2012) (Apartado 5.2.2.1 de Materiales y Métodos). Los productos digeridos se visualizaron en geles de agarosa al 2% y su tamaño fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular, 100 pbDNA Ladder (Nippon® Genética Europe GmbH) (Apartado 6.1 de Materiales y Métodos).

2.5. Secuenciación del ADN de los productos de PCR *cytb-nd1*

Las dos hebras de ADN de los productos de la PCR *cytb-nd1* fueron secuenciadas por duplicado utilizando el mismo conjunto de oligonucleótidos que en la PCR. Para la secuenciación se utilizó el kit comercial *Big-Dye® terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit V3.1* (Applied Biosystems®) y el secuenciador automático *ABI Prism® DNA Analyzer 3730XL* (Applied Biosystems®, Foster City, EEUU). Las secuencias obtenidas fueron revisadas y editadas usando el software *MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)* (Tamura *et al.*, 2011).

2.6. Alineamiento y edición de las secuencias de ADN

Las secuencias de ADN generadas a partir de los 155 especímenes de flebótomos capturados en España (panel 1) y las 277 secuencias de ADN obtenidas del GenBank (panel 2) fueron cargadas en *MEGA 6.0* (Tamura *et al.*, 2013) para ser alineadas usando el algoritmo *ClustalW* (J. Thompson *et al.*, 1994). Las secuencias de la región parcial que compone *cytb-nd1* se editaron eliminando la secuencia no flanqueada por los oligonucleótidos *PhleF* y *PhleR* usados en la amplificación de este producto. Una secuencia de *P. perniciosus* obtenida del Genbank (Número de Acceso: JF766956) fue utilizada como referencia para el alineamiento y la edición. Algunas fueron editadas minimamente para completar la falta de información en algunas posiciones, utilizando para ello las secuencias consenso de la especie. Las secuencias de los oligonucleótidos se mantuvieron en los extremos de cada secuencia para simular el producto de PCR.

Tabla 41. Descripción de los países de muestreo, especies y número de especímenes incluidos en el Panel 2 ($N = 277$), para los cuales se obtuvo la secuencia de la región *cytb-nd1* del GenBank.

Especies (Nº de especímenes)	País (Nº de especímenes)
<i>P. perniciosus</i> (26)	Italia (6), Malta (3), Portugal (6), España (1), Túnez (9), Italia/Malta/Túnez (1) ^a
<i>P. longicuspis</i> (6)	Marruecos (1), Túnez (5)
<i>P. ariasi</i> (45)	Argelia (1), Francia (10), Portugal (8), España (26)
<i>P. papatasi</i> (31)	Afganistán (4), Chipre (2), Egipto (5), Irán (1), Israel (3), Italia (8), Jordania (1), Palestina (3), Siria (2), Turquía (2)
<i>P. chabaudi</i> (32)	Argelia (5), Túnez (27)
<i>P. neglectus</i> (6)	Italia (6)
<i>P. perfiliewi</i> (26)	Argelia (4), Grecia (5), Italia (17)
<i>P. riouxii</i> (13)	Argelia (9), Túnez (4)
<i>P. sergenti</i> (57)	Grecia (1), Irán (48), Líbano (1), Marruecos (1), Siria (1), Túnez (4), Turquía (1)
<i>P. chadlii</i> (2)	Argelia (2)
<i>P. balcanicus</i> (2)	Irán (2)
<i>P. caucasicus</i> (25)	Afganistán (4), Irán (21),
<i>S. minuta</i> (6)	Italia (6)

^a Las secuencias fueron asociadas a estos tres países según los autores.

Los flebotomos se capturaron durante el período 1997-2003 según la información proporcionada por los autores en los identificadores de cada secuencia o en la información asociada a la publicación (información disponible en el Anexo 5).

2.7. Análisis *in-silico*, Ase I RFLP

Se llevó a cabo un análisis virtual de RFLP con todas las secuencias flanqueadas por los oligonucleótidos PhleF y PhleR de los panel 1 y 2 ($N = 432$) usando el programa NEBcutter V2.0, NEW ENGLAND BioLabs® Inc. (Vincze *et al.*, 2003), el cual permite realizar una digestión teórica con diferentes enzimas de restricción. Los ajustes para el análisis virtual con Ase I incluían, gel de agarosa al 2% y resolución completa del marcador de ADN 100 pb para determinar el tamaño, $L=70\text{mm}$.

3. RESULTADOS

En este estudio se analizaron secuencias de ADN de 13 especies de flebótomos de cinco diferentes subgéneros: 249 del subgénero *Larroussius* (152 *P. perniciosus*, 6 *P. longicuspis*, 57 *P. ariasi*, 26 *P. perfiliewi*, 2 *P. chadlii*, 6 *P. neglectus*), 33 del subgénero *Phlebotomus* (*P. papatasi*), 127 del subgénero *Paraphlebotomus* (57 *P. sergenti*, 13 *P. riouxi*, 32 *P. chabaudi*, 25 *P. caucasicus*), 2 del subgénero *Adlerius* (*P. balcanicus*), y 21 del subgénero *Sergentomyia* (*S. minuta*).

3.1. *Cytb-nd1* PCR y *Ase I* RFLP en especímenes del Panel 1

El ADN de todas las muestras del Panel 1 se amplificó con éxito utilizando el método de *cytb-nd1* PCR. Los productos de PCR obtenidos presentaron un tamaño de entre 472 y 482 pb en función de la especie de flebótomo (Figura 49 y Tabla 42). El análisis con *Ase I* RFLP se realizó en un limitado número de muestras de ADN de flebótomos, una representación de cada una de las secuencias variantes por especie se incluyó en el análisis (haplotipos). En todos los casos, la digestión de los productos de PCR mostraba perfiles de restricción idénticos a los determinados por el análisis *in silico*. (Figura 47). Los perfiles de *Ase I* RFLP para *P. ariasi*-variante 1 y *P. perniciosus*-variante 2 produjeron prácticamente un patrón idéntico que comprendía bandas de 26 y 455 pb. Por otra parte, *P. perniciosus*-variante 1 presenta un patrón distinto con dos bandas de aproximadamente 100 y 350 pb. El ejemplar de *P. papatasi* mostraba una banda de 375 pb, mientras que *S. minuta* generaba una banda de 230-bp (Figura 47 y Tabla 42).

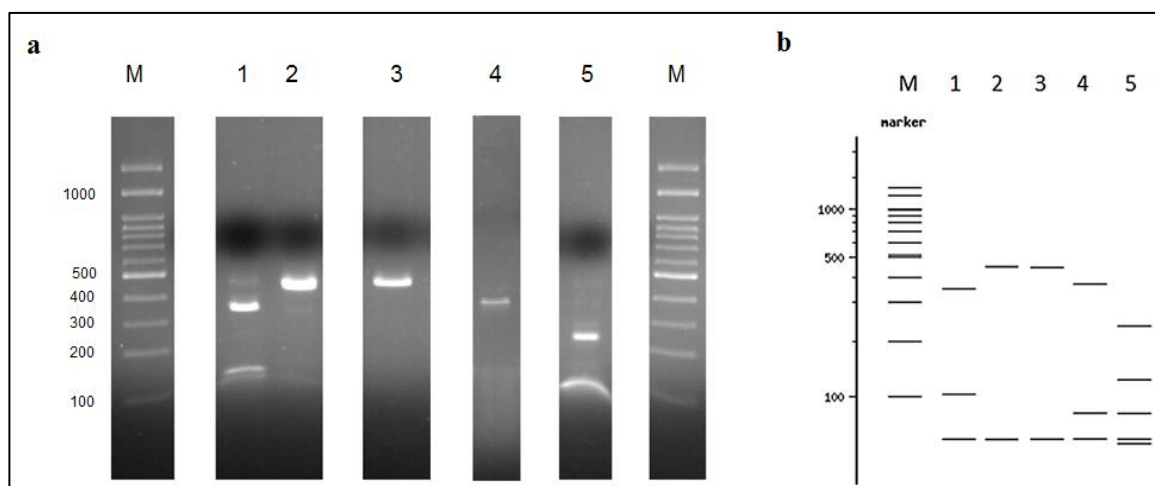


Figura 47. Perfiles *Ase I* RFLP de los productos de *cytb-nd1* PCR en las secuencias seleccionadas y representativas de cada una de las especies colectadas en España (Panel 1). Marcador de peso molecular de 100 pb (Línea M), *P. perniciosus*-variante 1 (Línea 1), *P. perniciosus*-variante 2 (Línea 2), *P. ariasi*-variante 1 (Línea 3), *P. papatasi* (Línea 4) y *S. minuta* (Línea 5). **a.** Experimento en el laboratorio de *Ase I* RFLP y **b.** Análisis “*in-silico*” *Ase I* RFLP de los mismos especímenes analizados en la figura **a** usando el software NEBcutter V2.0.

3.2. Alineamiento y edición de las secuencias de ADN del *cytb-nd1*

Se construyó un alineamiento final a partir de las secuencias de ADN de los especímenes incluidos en los paneles 1 ($N=155$) y 2 ($N=277$). El alineamiento (incluyendo las secuencias de los oligonucleótidos) comprendía los nucleótidos de las posiciones 440 a la 920 de la secuencia usada como referencia (*P. perniciosus*; No. Acceso GenBank JF766956) la cual contiene una región del gen *citocromo b* (*cytb*), la secuencia completa del *tRNA-Ser*, y una región del gen que codifica para la subunidad 1 de la *NADH deshidrogenasa* (*nd1*). Las secuencias de ADN analizadas mostraron diferentes tamaños para los productos de PCR en cada una de las especies estudiadas, con un rango entre 472 a 491 pb. Esto se debe principalmente a la variabilidad de la longitud de la secuencia del espaciador intergénico mitocondrial-1 (*Igs1*) que se encuentra entre el gen *cytb* y *tRNA-Ser* (Figura 49) (véase más adelante). Las 155 secuencias de ADN del panel 1 se depositaron en el GenBank con los siguientes números de acceso: *P. perniciosus* KP685413-KP685538, *P. ariasi* KP685539-KP685550, *P. papatasi* KP702248 y KP702249, y *S. minuta* KP702250-KP702264.

3.3. Evaluación “in-silico” de los perfiles de Ase I RFLP de la región *cytb-nd1* de los paneles 1 y 2.

El análisis teórico (“in-silico”) de Ase I RFLP se realizó en 432 secuencias de ADN de *cytb-nd1* que comprendía 13 especies de flebotomos, las cuales mostraron 16 perfiles de RFLP distintos (I-XVI). Una imagen virtual de estos 16 perfiles se presenta en la Figura 50 (véase más adelante). Los detalles específicos para cada espécimen se indican en el Anexo 5. Estos resultados fueron idénticos a los obtenidos en la parte experimental de este estudio para el subconjunto del panel 1 analizado con Ase I (Figura 47).

Un único, pero no necesariamente distintivo, patrón de RFLP se obtuvo en todos los especímenes de las siguientes especies: *P. papatasi* (patrón VI), *P. neglectus* (IX), *P. perfiliewi* (X), *P. riouxi* (VII), *P. chadlii* (XIII), y *P. balcanicus* (VII). Entre todas las especies, únicamente *P. papatasi* mostró un patrón único especie-específico que podía ser distinguido de manera inequívoca. Además, *P. riouxi* y *P. balcanicus* compartían un patrón (VII) que también era idéntico al observado en 31 de 32 ejemplares de *P. chabaudi* (variante 1). Las especies restantes presentaron dos patrones distintivos cada una: *P. perniciosus* (151 especímenes asignados al patrón I, y uno al patrón II), *P. ariasi* (56 especímenes con el patrón IV, y uno con el patrón V), *P. longicuspis* (5 con el patrón III, y uno con patrón I), *P. chabaudi* (31 especímenes presentaban el patrón VII, y uno el VIII), *P. sergenti* (52 especímenes con el patrón XI y 5 con el XII), *P. caucasicus* (24

especímenes con el patrón XIV, y uno con el XI, y *S. minuta* (16 especímenes con el patrón XV, 5 con el XVI) (Tabla 42).

Siete especies no pudieron ser diferenciadas con precisión al presentar el mismo perfil de *Ase I* RFLP. Observamos que el patrón I era común entre 151 *P. perniciosus* y 1 *P. longicuspis*; el patrón VII lo presentaban los especímenes de *P. riouxi*, *P. balcanicus* y 31 de 32 especímenes de *P. chabaudi*; y encontramos el patrón XI en 52 de 57 *P. sergenti* y 1 *P. caucasicus*.

Asimismo, el análisis de *Ase I* RFLP “in-silico” muestra un número de patrones muy similares entre sí, como: el patrón III (26, 90, 104, 261 pb) obtenido en 5/7 *P. longicuspis* y el patrón X (26, 90, 104, 260 pb) observado en *P. perfiliewi*; ó el patrón II (26, 455 pb) de 1/152 *P. perniciosus*, el IV (26, 454 pb) de 56/57 *P. ariasi*, el VII (26, 446 pb) en 31/32 *P. chabaudi*, *P. riouxi* y *P. balcanicus*, el patrón IX (26, 465 pb) en *P. neglectus*, el patrón XI (26, 450 pb) en 52/57 *P. sergenti* y 1/15 *P. caucasicus* y el patrón XIII (26, 451 pb) en *P. chadlii* (Figura 48).

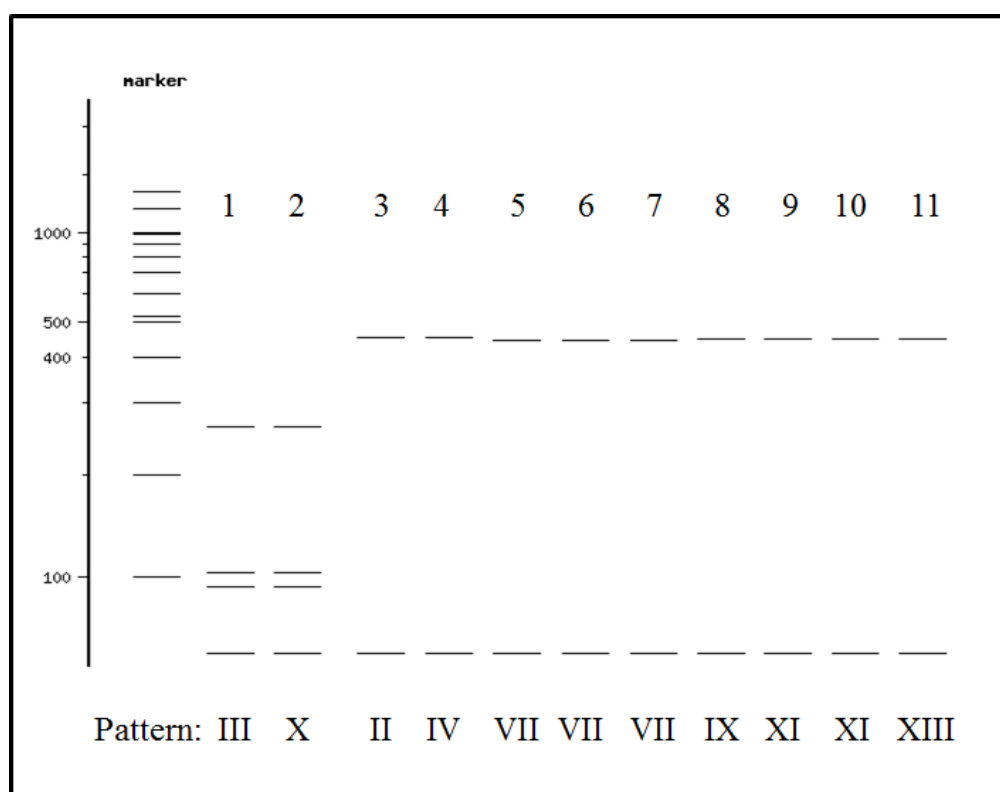


Figura 48. Análisis “in silico” de *Ase I* RFLP utilizando la herramienta NEBcutter V2.0. Se exponen los patrones de RFLP que son similares o casi indistinguibles entre sí. Los patrones se indican en números romanos en la parte inferior de la imagen. La carrera virtual muestra los productos digeridos en un gel de agarosa al 2% del valor teórico y la resolución completa de un marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 1: *P. longicuspis*_1; Carril 2: *P. perfiliewi*; Carril 3: *P. perniciosus*_2; Carril 4: *P. ariasi*_1; Carril 5: *P. chabaudi*_1; Carril 6: *P. riouxi*; Carril 7: *P. balcanicus*; Carril 8: *P. neglectus*; Carril 9: *P. sergenti*_1; Carril 10: *P. caucasicus*_1; Carril 11: *P. chadlii*.

	trRNA>	Igs2	Igs2>	ndl															
P. perniciosus	TTAACTTTAC	TAAATTTAAT	TATTATAATA	AAATAATTTT	TAACCCAATA	AAAAAAATAA	TAAAACATAA	AGAAGCAGGT	AAATATCTTT	TTCATACTAA	ATATATTAAT	TTATCATAAW							
P. longicuspis	TTAACTTTAC	TAAATTTAAT	TATTATAATA	AAATAATTTT	TAACCCAATA	AAAAAAATAA	TAAAACATAA	AGAAGCAGGT	AAATATCTTT	TTCATACTAA	ATATATTAAT	TTATCATAAW							
P. ariasi	TTAACTTTAC	TAATTTTAAT	TATTATAATA	AAATAATTTT	TAATCCAATA	AAAAAAATAA	TATAACATAA	TGAAGCAGGT	AAATAACTTT	TTCAAACATAA	ATATATTAAT	TTATCATAAW							
P. papatasi	TTAACTTTAC	TATATTTAAT	TATTATAATA	AAATTAATTTT	TAAACCAATA	AACAAACTAA	TAAAACATAA	AGAAGCAGGC	AAATATCTTT	TTCAAACATAA	ATATATTAAT	TTATCATAAW							
P. chabaudi	TTAACTTTAC	TAATTTTAAT	TATTATAATA	AAATAATTTT	TAAACCAATA	AATAAACAAA	TAAAACACAA	AGAAGCAGGT	AAATATCTTT	TTCATACTAA	ATATATTAAT	TTATCATAAW							
P. neglectus	TTAACTTTAC	TAATTTTAAT	TATTATAATA	AAATAATTTT	TAACCCGATA	AAAAAAATAA	TAAAACATAA	AGAAGCAGGT	AAATATCTTT	TTCAAACATAA	ATATATTAAT	TTATCATAAW							
P. perfiliewi	TTAACTTTAC	TAAATTTAAT	TATTATAATA	AAATAATCTT	TAATCCAATA	AAAAAAATAA	TAAAACATAA	AGAAGCAGGT	AAATATCTTT	TTCATACTAA	ATATATTAAT	TTATCATAAW							
P. riouxi	TTAACTTTAC	TAATTTTAAT	TATTATAATA	AAATAATCTT	TAAACCAATA	AATAAACAAA	TAAAACACAA	AGAAGCAGGC	AAATATCTCT	TTCATACTAA	ATATATTAAT	TTATCATAAW							
P. sergenti	TTAACTTTAC	TAAATTTAAT	TATTATAATA	ACACTATCTT	TAAACCAATA	AATAAACAAA	TAAAACACAA	AGATGCAGGT	AAATATCTCT	TTCATACTAA	ATATATTAAT	TTATCATAAW							
P. chadlii	TTAACTTTAC	TAATTTTAAT	TATTATAATA	AAATAATTTT	TAATCCAATA	AAAAAAATAA	TATAACATAA	TGAAGCAGGT	AAATAACTTT	TTCAAACATAA	ATATATTAAT	TTATCATAAW							
P. balcanicus	TTAACTTTAC	TAAATTTAAT	TATTATAATA	AAATAATTTT	TAATCCAATA	AAAAAAATAA	TAAAATACAA	TGAAGCAGGT	AAATATCTTT	TTCATACTAA	ATACATTAAT	TTATCATAAW							
S. minuta	TTAACTTTAC	TAAATTTAAT	TAT-ATAATA	ATATTAATTT	TAATCTAATA	TAAAAAATAA	AAAAACATAA	AGATAAAGGT	AAATATCTTT	TTCAAACATAA	ATACATTAAT	TTATCATAAW							
	361			391			421			451		471							
		ndl>																	
P. perniciosus	CGAAWTCGAG	GC	[481]																
P. longicuspis	CGAAWTCGAG	GC	[481]																
P. ariasi	CGAAWTCGAG	GC	[480]																
P. papatasi	CGAAWTCGAG	GC	[472]																
P. chabaudi	CGAAWTCGAG	GC	[472]																
P. neglectus	CGAAWTCGAG	GC	[491]																
P. perfiliewi	CGAAWTCGAG	GC	[480]																
P. riouxi	CGAAWTCGAG	GC	[472]																
P. sergenti	CGAAWTCGAG	GC	[476]																
P. chadlii	CGAAWTCGAG	GC	[477]																
P. balcanicus	CGAAWTCGAG	GC	[472]																
S. minuta	CGAAWTCGAG	GC	[482]																
	481																		

Figura 49. Continuación. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleotídicas de la región parcial del gen *cytb-ndl* a partir de muestras representativas para cada una de las especies de flebótomo estudiados en este trabajo (*P. perniciosus*, *P. longicuspis*, *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. chabaudi*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. riouxi*, *P. sergenti*, *P. chadlii*, *P. balcanicus* y *S. minuta*). Los genes correspondientes se indican en la parte superior del alineamiento. Los números en la parte inferior indican las posiciones de nucleótidos. Números al final de cada línea indican la longitud en pb de cada secuencia.

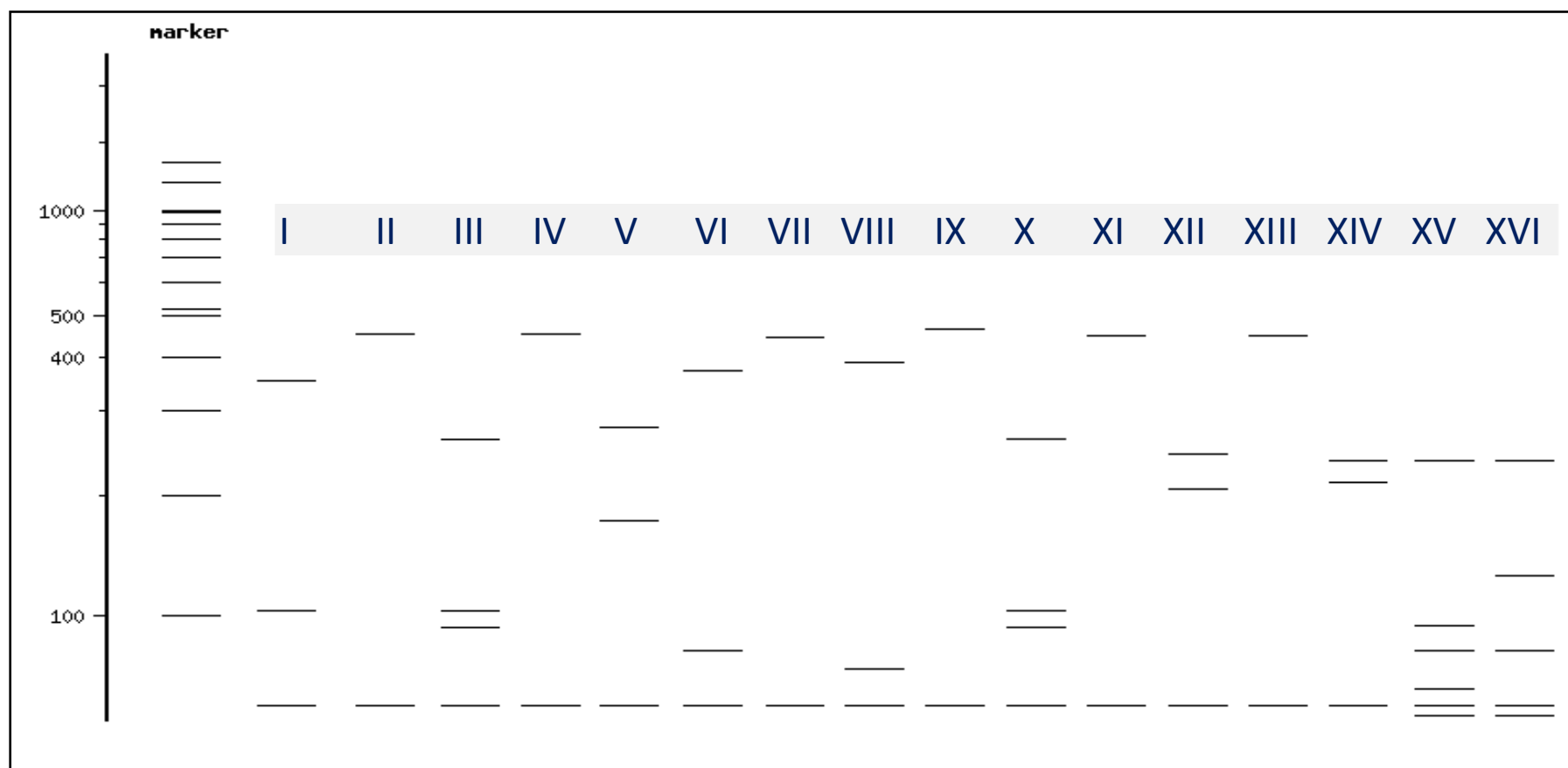


Figura 50. Análisis virtual (“*in silico*”) producido con NEBcutter V2.0 que muestra los dieciséis patrones de RFLP obtenidos a partir de las secuencias de ADN *cytb-nd1* de los paneles-1 y -2. Los patrones se indican en números romanos. La carrera virtual muestra los productos digeridos en una electroforesis en gel de agarosa al 2% de valor teórico y la resolución completa de un marcador de peso molecular de 100 pb. L=70mm. De izquierda a derecha se indican los patrones: Patrón I: *P. perniciosus_1*, *P. longicuspis_2*; Patrón II: *P. perniciosus_2*; Patrón III: *P. longicuspis_1*; Patrón IV: *P. ariasi_1*; Patrón V: *P. ariasi_2*; Patrón VI: *P. papatasi*; Patrón VII: *P. riouxi*, *P. balcanicus*, *P. chabaudi_1*; Patrón VIII: *P. chabaudi_2*; Patrón IX: *P. neglectus*; Patrón X: *P. perfiliewi*; Patrón XI: *P. sergenti_1*, *P. caucasicus_1*; Patrón XII: *P. sergenti_2*; Patrón XIII: *P. chadlii*; Patrón XIV: *P. caucasicus_2*; Patrón XV: *S. minuta_1*; Patrón XVI: *S. minuta_2*.

Tabla 42. Resumen de los patrones obtenidos por Ase I RFLP en las 432 secuencias de ADN consideradas en este estudio. Se incluye información relativa a las especies de flebótomos, número de especímenes, tamaño previsto de los productos digeridos y longitud de las secuencias.

Patrón Ase I	Especies ^a	Especímenes No. total y No. por variantes		Nº de cortes	Bandas de Restricción (b.p)	Bandas de Restricción (Latrofa <i>et al.</i> , 2012)	Longitud de la Secuencia (p.b)
I	<i>P. perniciosus_1</i>		151	2	26, 104, 351		481
II	<i>P. perniciosus_2</i>	152	1	1	26, 455	28, 104, 351	
III	<i>P. longicuspis_1</i>		5	3	26, 90, 104, 261		
I	<i>P. longicuspis_2</i>	6	1	2	26, 104, 351	ND ^b	
IV	<i>P. ariasi_1</i>		56	1	26, 454		480
V	<i>P. ariasi_2</i>	57	1	2	26, 178, 276	ND	
VI	<i>P. papatasi</i>		33	2	26, 72, 374	28, 72, 374	
VII	<i>P. riouxi</i>		13	1	26, 446	ND	
VII	<i>P. balcanicus</i>		2	1	26, 446	ND	472
VII	<i>P. chabaudi_1</i>		31	1	26, 446	ND	
VIII	<i>P. chabaudi_2</i>	32	1	2	26, 57, 389	ND	
IX	<i>P. neglectus</i>		6	1	26, 465	28, 645	491
X	<i>P. perfiliewi</i>		26	3	26, 90, 104, 260	28, 90, 104, 260	480
XI	<i>P. sergenti_1</i>		52	1	26, 450		476
XII	<i>P. sergenti_2</i>	57	5	2	26, 206, 244	ND	
XIII	<i>P. chadlii</i>		2	1	26, 451	ND	477
XI	<i>P. caucasicus_1</i>		1	1	26, 450		476
XIV	<i>P. caucasicus_2</i>	25	24	2	26, 214, 236	ND	
XV	<i>S. minuta_1</i>		16	5	17, 26, 40, 72, 91, 236		482
XVI	<i>S. minuta_2</i>	21	5	4	17, 26, 72, 131, 236	17, 29, 72, 130, 236	

^a Algunas de las especies de flebótomos que se consideran en este estudio presentan distintas secuencias de ADN, estas se indican con un guión y el número de variante asignado en este estudio.

^b ND: No existen dat

4. DISCUSIÓN

El análisis experimental e “in silico” de las secuencias de la región *cytb-nd1* de las 13 especies de flebótomos incluidas en este estudio demuestra que el protocolo de *cytb-nd1* PCR *Ase* I RFLP no es aplicable para la identificación de las especies de flebótomos en toda la región mediterránea como en un principio habían propuesto (Latrofa *et al.*, 2012). Nuestros datos confirman que no es posible obtener un único, y distintivo patrón para cada uno de las especies estudiadas, a excepción de *P. papatasi* y *S. minuta*. Hemos encontrado un significativo número de especies con perfiles de RFLP idénticos o casi indistinguibles. Este hecho representa un problema para identificar especies con un patrón de RFLP similar en regiones en que son co-endémicas. Este es el caso de *P. perniciosus* patrón II y *P. ariasi* patrón IV, patrones prácticamente indistinguibles, ambos identificados en ejemplares españoles, y siendo ambas especies vectores de *L. infantum*. Es importante destacar que esta falta de poder discriminatorio ha sido recientemente reportada usando esta misma metodología por Bounamous *et al.*, (2014). En este estudio, los autores fueron incapaces de discriminar entre 17 especies de flebótomos presentes en Argelia, aun usando un método de doble digestión enzimática empleando las endonucleasas *Ase* I y *Mnl* I.

Es importante tener en cuenta que el estudio de Latrofa *et al.*, (2012) se limitó a especímenes de flebótomos capturados en el Sur de Italia. En nuestro subconjunto de muestras italianas (n= 6) procedentes de la misma área, se obtienen resultados similares a los publicados, excepto para *S. minuta*. Por lo tanto, el patrón XVI (mostrado en Latrofa *et al.*, 2012) se identificó en 5 ejemplares de *S. minuta*, mientras que el ejemplar restante (No. Acceso GenBank. JF766981) presentaba el patrón XV, así como otros 15 especímenes de *S. minuta* de España.

Por tanto, la similitud de ciertos patrones de RFLP presenta un problema para la identificación de especies de flebótomos en especies simpátricas. Este podría ser el caso de *P. longicuspis* y *P. perfiliewi* en Argelia y Túnez, donde ambas especies son co-endémicas y se piensa que son potenciales vectores de *L. infantum* (Ready, 2013). La discriminación entre las dos especies de estos países mediante este método sería algo muy difícil de lograr si obtenemos el patrón III (como en los cinco de los seis *P. longicuspis* en este trabajo) o el patrón X (en los 26 *P. perfiliewi* estudiados aquí). Así mismo, observamos que un espécimen de *P. longicuspis* con origen marroquí presentaba el PCR-RFLP patrón I, al igual que la mayoría de los especímenes de *P. perniciosus* analizados. Estas dos especies coexisten en varios países y son notablemente similares morfológicamente. En España, donde hasta la fecha únicamente se han descrito ejemplares machos, la presencia de *P. longicuspis* y *P. perniciosus* ha sido bastante cuestionada (Guernaoui *et al.*, 2005).

Por otra parte, la similitud que hemos observado entre los patrones II (en 1/152 *P. perniciosus*), IV (en 56/57 *P. ariasi*), VII (en 31/32 *P. chabaudi*, *P. riouxi*, y *P. balcanicus*), y IX (*P. neglectus*) podría afectar la identificación definitiva de estas especies debido a la superposición en la distribución geográfica entre *P. ariasi* y *P. perniciosus*; esto sería especialmente importante en Italia, donde *P. ariasi*, *P. perniciosus* y *P. neglectus* coexisten. Aunque en el caso de *P. perniciosus* y *P. ariasi* se ha comprobado su papel como vector de *L. infantum*, este no ha sido el caso para *P. neglectus* (Ready, 2013).

Es importante señalar que *P. riouxi* y *P. chabaudi* son especies similares desde el punto de vista morfológico y taxonómico. Además, de ser especies simpátricas en regiones como Argelia y Túnez. De acuerdo con el análisis de las secuencias de ADN del *cytb*, no se observaron diferencias significativas a nivel de nucleótidos para considerar a *P. riouxi* y *P. chabaudi* como especies independientes, tal y como ha sido propuesto por Bounamous *et al.*, (2014). Esta noción es también apoyada por datos filogenéticos obtenidos del análisis de otros marcadores moleculares, incluyendo el *cytb* y el factor de elongación 1- α (*ef-1- α*) (Tabbabi *et al.*, 2014).

El patrón VII fue el único perfil compartido por dos diferentes subgéneros (*Paraphlebotomus* y *Adlerius*). Por lo tanto, sería útil analizar los patrones de RFLP en otras especies de flebótomos pertenecientes al subgénero *Adlerius* que fuesen endémicas en la región mediterránea. La similitud entre los patrones XI (en 52/57 *P. sergenti* y en 1/25 *P. caucasicus*) y XIII (*P. chadlii*) es otro problema, ya que estas tres especies coexisten en algunas áreas geográficas (ver en www.sandflycatalog.org). Mientras que se ha comprobado que *P. sergenti* podría ser vector de *L. tropica* (Ready, 2013), otros autores también han sugerido que *P. caucasicus* pueda llegar a serlo (Artemiev, 1978; Killick-Kendrick, 1999). Sin embargo, *P. chadlii* no ha sido descrito como vector competente hasta la fecha.

Por otra parte, una contribución significativa de este trabajo es la incorporación al GenBank de 155 nuevas secuencias de ADN de la región *cytb-nd1* de flebótomos capturados en España, incluyendo 126 *P. perniciosus* que se añaden a la única secuencia española del *cytb* que se encontraba disponible en el GenBank. Las 15 secuencias nuevas de *S. minuta* se suman a las seis que se encontraban previamente disponibles, y que correspondían a especímenes italianos.

Nuestros resultados demuestran que ni en España ni en toda la región mediterránea es posible diferenciar con precisión un flebótomo mediante el método de *cytb-nd1* PCR Ase I RFLP. Debido a que la muestra de secuencias de flebótomos de países de Oriente Medio está parcialmente representada en este estudio, no podemos concluir definitivamente sobre el rendimiento de este método en esta región. Teniendo en cuenta la variabilidad nucleotídica que existe en la secuencia *cytb-nd1*, creemos que un análisis filogenético o de código de barras de ADN (“DNA barcoding”),

permitiría una identificación más precisa de las diferentes especies, como ha sido propuesto por otros autores (Krüger *et al.*, 2011; Lanteri, 2007). Esta idea se abordará en el Capítulo 5.

Capítulo 5.

Aplicación de la metodología de código de barras de ADN (*DNA Barcoding*) para la identificación molecular de especies de flebótomos de la cuenca mediterránea

1. ANTECEDENTES

En el Viejo Mundo existen 42 especies de flebótomos cuya capacidad vectorial ha sido confirmada o es probable. Veinte de estas especies están implicadas en la transmisión de *L. infantum*, 6 en la de *L. donovani*, 7 en la de *L. major*, 7 en la de *L. tropica* y 3 en la de *L. aethiopica* (ver Tabla 3). Por lo general, cada especie de vector está implicada en la transmisión de una sola especie de *Leishmania*; excepto *P. sergenti*, que ha sido incriminado en la transmisión de *L. tropica* y *L. aethiopica* en partes de Etiopía, y *P. alexandri*, vector de *L. donovani* y *L. infantum* en China (Maroli *et al.*, 2013; Ready, 2013; Seccombe *et al.*, 1993).

Las especies de flebótomos implicadas en la transmisión de la leishmaniasis en la cuenca mediterránea pertenecen a los subgéneros *Larroussius*, *Phlebotomus* y *Paraphlebotomus* (Maroli *et al.*, 2013; Seccombe *et al.*, 1993; WHO, 2010). En España las dos especies de flebótomos capaces de transmitir *L. infantum* son *P. perniciosus* y *P. ariasi* (Gil-Collado *et al.*, 1989; Miró & Molina, 2006). Otras especies de *Phlebotomus* presentes en España son *P. papatasi*, *P. langeroni*, *P. sergenti*, *P. mascitti*, *P. longicuspis*, *P. fortunatarum*, *P. alexandri* y *P. chabaudi* (Conesa-Gallego *et al.*, 1997; Gallego-Berenguer *et al.*, 1992; Gil-Collado *et al.*, 1989).

A pesar de esta característica distribución, los cambios ambientales, demográficos y climáticos, amenazan con favorecer la introducción de otras especies vectores no endémicas en Europa, y quizás con ellas otras especies de *Leishmania* (Aransay *et al.*, 2003; Maroli *et al.*, 2013; Medlock *et al.*, 2014; Ready, 2013). Además, diversas especies de flebótomos a menudo coexisten en las zonas de transmisión de leishmaniasis, por lo que la identificación de la especie juega un papel importante en el seguimiento de sus poblaciones y el control de las enfermedades que transmiten (Ready, 2010; WHO, 2010).

La identificación de la subfamilia *Phlebotominae* se ha basado tradicionalmente en las características morfológicas y el análisis morfométrico de un gran número de estructuras, principalmente de la cabeza y genitalia (Lewis, 1987). No obstante, la identificación morfológica presenta una serie de inconvenientes:

- i. La plasticidad fenotípica de los caracteres utilizados para el reconocimiento de las especies pueden conducir a identificaciones incorrectas (Hebert, *et al.*, 2003; Packer *et al.*, 2009). Existen varios estudios que han demostrado la variación fenotípica intraespecífica en los flebótomos, lo que podría impedir la discriminación entre especies, pasando por alto aquellos complejos crípticos que son comunes en muchos grupos, o de modo contrario, agrupando inadecuadamente las subpoblaciones de diferentes especies de vectores (Depaquit *et al.*, 2000, 2002; Hebert *et al.*, 2003a; Uribe *et al.*, 2001).

- ii. Las claves morfológicas suelen ser eficaces sólo para una etapa de la vida del flebótomo (adultos), y en ocasiones para un género (hembras), lo que dificultaría la identificación de algunos especímenes.
- iii. A menudo, el uso de claves exige un alto nivel de conocimiento y solo los taxónomos y entomólogos experimentados pueden utilizarlas de manera fiable entre estos dípteros (Hebert *et al.*, 2003a; Latrofa *et al.*, 2011).
- iv. Existen, además otras situaciones donde la identificación basada en caracteres morfológicos no puede ser aplicada como, por ejemplo, en ejemplares deteriorados, o cuando las técnicas de aclarado y montaje no se realizan apropiadamente.

Ante estas limitaciones, surge la necesidad de un sistema de identificación genético que permita la identificación de las especies a través del análisis de una diana de su genoma que se mantenga inalterada entre especímenes en cualquiera de sus estadios de desarrollo o parte de ellos (Hubert & Hanner, 2015; Tautz *et al.*, 2002). Con esta idea se desarrolla el estudio de códigos de barras de ADN o *DNA barcoding*, una aproximación molecular que permite identificar rápidamente y de manera fiable la especie a la cual pertenece un organismo (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert & Gregory, 2005; Jinbo *et al.*, 2011; Virgilio *et al.*, 2010).

Para poder designar un código de barras de ADN se utilizan genes que presentan las siguientes características:

- a) El gen debe ser casi idéntico en organismos de las mismas especies, pero distinto entre individuos de diferentes especies;
- b) La secuencia completa o la sección del gen a analizar debe estar estandarizada, la misma sección debe ser usada en diferentes grupos taxonómicos; el gen debe presentar sitios conservados que permitan la unión a cebadores para una amplificación y secuenciación eficaz (Hebert *et al.*, 2004).

Hebert *et al.*, 2003a sugieren el uso del fragmento 5' del gen mitocondrial que codifica para la Citocromo Oxidasa subunidad I (COI). Esta es una secuencia estandarizada de 658 nt que se compara con una base de datos de secuencias conocidas. El gen mitocondrial *coi* es un excelente marcador ya que posee una tasa de evolución entre cinco y 10 veces más rápida que la de genes nucleares de copia única (Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2003b).

Recientemente las investigaciones se han enfocado en la secuenciación de otros genes mitocondriales, entre los se destaca el gen citocromo b (*cytb*), como uno de los marcadores más empleados en el análisis genético de poblaciones y estudios de sistemática molecular de flebótomos (Boudabous *et al.*, 2009, 2012; Depaquit, 2014).

El objetivo del Capítulo 5 es evaluar el enfoque de código de barras de ADN en la identificación molecular de especies de los géneros *Phlebotomus* y *Sergentomyia*, estudiando la secuencia de dos genes que forman parte del genoma mitocondrial: los genes *coi* y *cytb*. A partir del estudio de 288 secuencias del gen *coi* y 491 del *cytb* de flebótomos de España y otros países de la cuenca mediterránea y Oriente Próximo, se valida la utilidad de estas dianas para la identificación molecular de especies de flebótomos y el análisis de la diversidad genética de este grupo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar la evaluación de los marcadores moleculares COI y CYTB como herramientas en la identificación de flebótomos este trabajo contiene dos grandes grupos de secuencias de ADN. La primera colección analizada en este estudio se obtuvo a partir de especímenes capturados en diferentes regiones de España (n=155). La segunda colección se compone de secuencias depositadas en el Genbank.

2.1. Área de estudio de la Colección 1: flebótomos capturados en España, (n=155)

El área de estudio abarca 11 localidades españolas que ya se describieron en el capítulo 4. En la Tabla 40 se proporciona una descripción de los 155 ejemplares. Los métodos de captura y procesamiento de los flebótomos que componen la Colección 1 se realizaron según los protocolos descritos en el Capítulo 4. Con el apoyo de las entomólogas del grupo Epicontrol- carnívoros del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) se realizaron las disecciones e identificaciones (Apartado 3.1.3 de Materiales y Métodos). La identificación morfológica se basó en el estudio de la genitalia en machos, cabeza y espermatecas en las hembras, el resto del cuerpo del flebótomo se conservó a -20 °C para la posterior extracción de ADN y análisis moleculares, como se describe en el Apartado 4.1 de Materiales y Métodos.

2.2. Revisión bibliográfica y búsqueda de secuencias de ADN de flebótomos en el Genbank, Colección 2 (n= 469)

Para la evaluación de los marcadores en especies representativas de la cuenca mediterránea, fue necesario incluir secuencias adicionales a las de la Colección 1. Para ello se realizó una búsqueda bibliográfica recopilando trabajos científicos publicados hasta febrero de 2015, en los que se utilizase las secuencias de los genes *cytb* y *coi*, y se detallara la distribución de flebótomos en

países del sur de Europa, norte de África y otras regiones anexas de Oriente próximo. La revisión se realizó en la base de datos *Science Direct* (<http://www.sciencedirect.com/>), Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Para la búsqueda se emplearon palabras claves como el taxón (“*Phlebotomus*”, “*Sergentomyia*”), combinado con los distintos identificadores de cada uno de los genes como: *coi*, *co1*, *CO1*, *cytochrome oxidase 1*, *cytb*, *cyt b*, *cyt-b*, *cytochrome b*, *cytochrome-b*. Las secuencias de ADN identificadas mediante esta búsqueda fueron descargadas desde el Genbank.

En total, este estudio incluye 15 especies de flebótomos representadas con 133 secuencias del gen *coi* procedentes de 8 países y 336 secuencias del gen *cytb* de 18 especies localizadas en 21 países. Los códigos de acceso de las secuencias y las características más relevantes de esta Colección 2 se muestran en la transición (Tabla 45 y Tabla 48).

2.3. Análisis Molecular de los flebótomos de la Colección 1

2.3.1. Extracción y precipitación de los ácidos nucleicos del flebótomo

Para la extracción se utilizó la parte del flebótomo conservada a -20°C tras retirar la cabeza y la genitalia (tórax, abdomen, paras y alas) como se indicó anteriormente. Todos los especímenes fueron sometidos a extracción de ADN usando el kit QIAamp® DNA Mini (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo indicado para tejidos según el fabricante con algunas modificaciones. Primero se colocaron 500 µl de tampón fosfato salino PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, pH7) en el tubo que contenía la muestra y se realizó un lavado con esta solución. Se eliminó el PBS 1X y se añadieron nuevamente 200 µl del mismo tampón. Con un micropistilo plástico estéril se realizó una maceración mecánica del material biológico y se agregaron 20 µl de Proteinasa K y 180 µl de tampón de lisis (ATL). Se homogenizó mediante vórtex y se incubó por 12 horas a 37°C en agitación. A partir de esta etapa se siguieron los pasos del protocolo convencional descrito en Materiales y Métodos Apartado 4.1. El ADN se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril para ser guardado a -20°C hasta su amplificación. La Figura 51 resume los análisis morfológico y molecular que se llevaron a cabo en las capturas entomológicas realizadas en España que forman parte de esta colección.

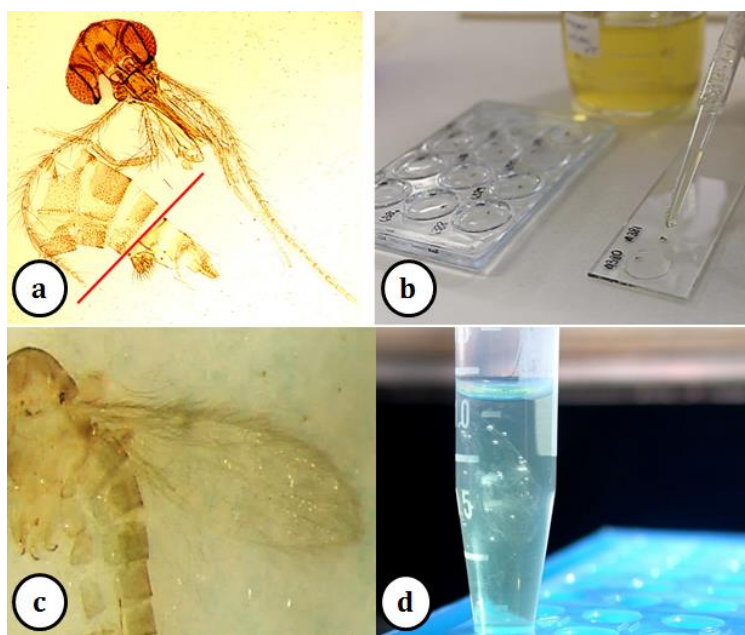


Figura 51. Resumen gráfico del procesamiento del material entomológico. **a)** Disección de cabeza y último segmento distal del abdomen (genitalia) y **b)** montaje en portaobjetos para observación bajo microscopio e identificación morfológica. **c)** eliminación del etanol de los fragmentos del flebótomo almacenados (restos de abdomen, alas, y patas) **d)** extracción de ADN para la posterior identificación molecular.

2.3.2. Amplificación de las regiones del ADNmt seleccionadas para el análisis de códigos de barras de ADN

En la Figura 52, se muestra un esquema representativo de la molécula circular de doble cadena que representa el ADNmt y el orden más generalizado en la clase *Insecta*, señalando las regiones seleccionadas para este estudio.

PCR-COI: Para la amplificación del gen *coi*, que consta de 658 pb, se siguió el protocolo propuesto por Hebert, *et al.*, (2003a) con algunas modificaciones. Los oligonucleótidos empleados en la reacción fueron: LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') y HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Sigma Aldrich®, Alemania), sentido y antisentido, respectivamente, a una concentración de 15 pmol/μl cada uno. La amplificación se llevó a cabo en mezclas de 50 μl de volumen final siguiendo las condiciones descritas en materiales y métodos apartado xx. Brevemente, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μl que contenían: 5 μl de ADN molde, 5 μl de solución tampón de PCR 10x (750mM DE Tris-HCl, pH 9.0; 500 mM de KCl; 200 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM de MgCl₂), 0,2 mM de cada dNTP, y 1.4 U de ADN polimerasa de *Thermus sp.* (Biotools®, Madrid, España) y 35.6 μl de agua destilada estéril. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: una

desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C; seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C; y una extensión final de 10 min a 72°C.

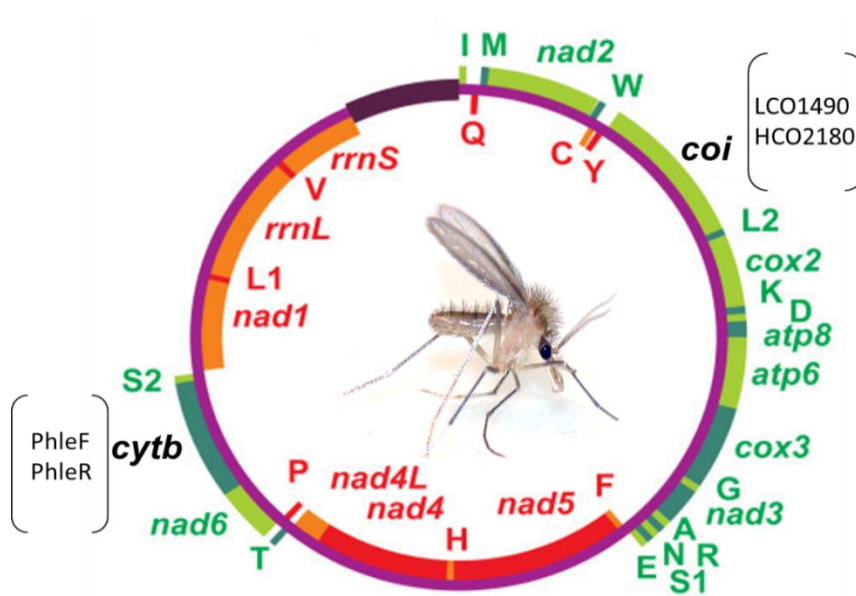


Figura 52. Orden que exhibe el ADN mitocondrial de los insectos. Los genes codificados en la cadena α (orientación hacia la derecha) se señalan en color verde (claro y oscuro). Los genes codificados en la cadena β (orientación hacia la izquierda) son de color rojo o naranja. Los nombres de genes son las abreviaturas estándar que se utilizan en este documento; las regiones candidatas en este estudio a códigos de barras se indican en color negro con los correspondientes oligonucleótidos a utilizar para su amplificación mediante PCR. Adaptado de Negrisolo *et al.*, (2011).

PCR-CYTB: Para la amplificación del gen *cytb* (~482 pb) se utilizaron los cebadores usados por Latrofa *et al.*, (2011), cuya secuencia es PhleF (5'-AAT AAA TTA GGAGGA GTA ATT GC-3') y PhleR (5'-GCC TCG AWT TCG WTT ATG ATA AAT T-3'). Para las reacciones de PCR se utilizaron 2 μ l de ADN molde (50-100 ng) en un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de mezcla y condiciones de PCR se describen en el capítulo 4, (Apartado 5.2.1 de Materiales y Métodos).

2.3.3. Secuenciación

La secuencia de los productos de amplificación de los genes *coi* y *cytb* se realizó en ambos sentidos de la doble hebra, en un secuenciador automático *ABI Prism® DNA Analyzer 3730XL* (Applied Biosystems®, Foster City, EEUU). Los ensayos de secuenciación se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 8 de Materiales y Métodos.

2.3.4. Edición y alineamiento de las secuencias de la Colección 1

Los 620 cromatogramas generados a partir de los productos de PCR de *coi* y *cytb* de los especímenes colectados en España, se revisaron y editaron utilizando el programa MEGA6 para generar la secuencia consenso en cada espécimen (n=155).

2.3.5. Análisis de las secuencias de ADN de la Colección 1 y Colección

Las secuencias de ADN de las Colecciones 1 y 2 fueron alineadas, en función de cada gen y la sección a analizar ajustada en función de la longitud de las secuencias referencia. En el caso del gen *coi* la secuencia referencia fue JN036765 (posiciones nt 38 a 658), mientras que la secuencia de referencia de *cytb* fue JF766956 (posiciones nt 451 a 715).

Se utilizó el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009) para determinar los sitios polimórficos, haplotipos totales y los haplotipos de cada especie y en estos el número de diferencias nucleotídicas (tanto las sustituciones por transición como por transversión), con lo que se determinaron los patrones de divergencia intra/interespecífica. El contenido nucleotídico de cada grupo de secuencias se calculó utilizando el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) y los datos son presentados en el texto como promedio.

2.3.6. Análisis de la distancia genética

Los análisis de distancia genética entre las secuencias se realizaron con el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), utilizando el código genético mitocondrial de *Drosophila*. A partir del alineamiento de las secuencias representativas de cada haplotipo, en cada gen, se calcularon las distancias genéticas utilizando tres modelos de sustitución: *Kimura 2-parámetros* (K2P) (Kimura, 1980), *p-distance*, y *Jukes Cantor* (JC) (ref), con un *bootstrap* de 1000 réplicas en cada una de las aproximaciones. El grado de variabilidad intra e interespecífica se determinó en el conjunto de datos en función de las distancias genéticas obtenidas.

2.3.7. Reconstrucción filogenética

Para determinar el mejor modelo de evolución en cada uno de los conjuntos de datos (alineamientos de *coi* y *cytb*), se utilizó el programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008), en el que

se calculó la máxima probabilidad de 24 modelos diferentes de sustitución de nucleótidos para cada marcador, teniendo en cuenta las frecuencias nucleotídicas y las tasas de variación (distribución gamma y proporción de sitios invariantes); y posteriormente se seleccionó el modelo más probable en función de los valores BIC (Criterio Bayesiano de Información) (Schwarz 1978) y de AICc (Criterio de Información de Akaike, corregido).

Basados en el modelo de evolución y las distancias calculadas, las representaciones gráficas de las relaciones filogenéticas se establecieron mediante dos enfoques de manera comparativa. El primero de ellos se llevó a cabo usando el programa informático MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013), y consistió en una matriz de distancia según el modelo de *Neighbor-Joining* (NJ) e incorporando cada uno los modelos de sustitución (K2P) (Kimura, 1980) y el modelo *p-distance*, respectivamente. Alternativamente, se realiza un segundo enfoque en el que se compara el método de Máxima Verosimilitud (*Maximum likelihood*, ML) que ofrecen los programas MEGA6 y el programa PhyML v.3 (*Maximum Likelihood Phylogenesis*, <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>)43) utilizando el modelo de sustitución GTR+G+I. El soporte de los nodos se evaluó utilizando 2000 réplicas de *bootstrap*. Los árboles filogenéticos se visualizaron y se editaron con el software FIGTREE v.1.2.2. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Previamente el alineamiento de secuencias en formato FASTA se transformó en formato PHYLIP, compatible con estos programas, a través del programa ALignment Transformation EnviRonment (ALTER) (Glez-Peña *et al.*, 2010) disponible a través del portal de internet: <http://sing.ei.uvigo.es/ALTER/>

3. RESULTADOS

3.1. Evaluación de las identificaciones taxonómicas vs. Identificación molecular.

Se amplificaron exitosamente los segmentos de los genes mitocondriales *coi* y *cytb* de 140 especímenes del género *Phlebotomus* y 15 del género *Sergentomyia*. Los detalles para cada muestra analizada, incluyendo la identificación de la especie, región geográfica de captura, haplotipo y número de acceso de secuencia en el Genbank se incluyen en la Tabla 43.

La herramienta BLASTn confirmó la identidad de los genes mitocondriales *coi* y *cytb* en todos los individuos de la Colección 1. Ciento veintiséis secuencias correspondieron a *P. perniciosus*, doce a *P. ariasi*, dos a *P. papatasi* y quince secuencias a *S. minuta*. La concordancia con la identificación morfológica fue del 100%.

Tabla 43. Relación de las secuencias del Conjunto 1 ($n=155$). Número de especímenes, origen y códigos de acceso de la colección de flebótomos para este estudio.

Especie (No.)	Provincia	Códigos de Identificación ^a	Haplotipos (No.)		Referencia	No. Genbank ^b
			COI	CYTb		
<i>P. perniciosus</i> (n= 126)	Sevilla (11)	19CAST1-3, 19CAST1-4, CAST3-1, 19CAST1-6, 19CAST1-7, 19CAST1-11, 19CAST1-12, 19CAST1-13, 19CAST1-14, 19CAST1-16, 419CAST1-18	PPERNO1 (10), PPERN22	PPERNO2 (11)	En este trabajo	KP685424↗ KP685434
	Guadalajara (1)	ZAO-1	PPERN38	PPERNO2	En este trabajo	KP685538
	Segovia (7)	ESCT6-1, ESCT6-2, ESCT6-3, ESCT6-4, ESCT6-5, ESCT10-2, ESCT10-1	PPERNO1 (7)	PPERNO2 (7)	En este trabajo	KP685453↗ KP685459
	Cáceres (3)	CAÑT-1, CAÑT-2a, CAÑT-2b	PPERNO1 (3)	PPERNO2 (3)	En este trabajo	KP685421↗ KP685423
	Ibiza (40)	IBIT1-1, IBIT1-2, IBIT1-3, IBIT1-4, IBIT1-5, IBIT1-6, IBIT1-7, IBIT1-8, IBIT1-10, IBIT2-1, IBIT2-2, IBIT2-3, IBIT2-4, IBIT2-5, IBIT2-6, IBIT2-7, IBIT2-8, IBIT2-9, IBIT2-10, IBIT2-11, IBIT2-12, IBIT2-13, IBIT214, IBIT2-15, IBIT2-16, IBIT2-17, IBIT2-19, IBIT2-20, IBIT2-21, IBIT2-22, IBIT2-23, IBIT2-24, IBIT2-25, IBIT2-26, IBIT2-27, IBIT2-28, IBIT2-29, IBIT2-30, IBIT8-7a, IBIT8-7b	PPERNO1 (8), PPERN26, PPERN27, PPERN28 (21), PPERN29, PPERN30 (2), PPERN31(2), PPERN32↗ PPERN35	PPERNO2 (38), PPERN12, PPERN13	En este trabajo	KP685481↗ KP685520
	Murcia (25)	ACHT3-1, ACHT3-2a, ACHT3-2b, ACHT4-1, ACHT4-2, ACHT4-3a, ACHT4-3b, ACHT4-3c, MORT1-1, MORT1-6, MORT1-7, MORT1-9a, MORT1-9b, MORT1-9c, MORT1-9d, MORT1-9e, MORT1-9f, MORT1-9g, MORT1-9h, MORT1-9i, MORT1-9j, MORT1-9k, MORT1-9l, MORT1-9m, MORT1-9n	PPERNO1 (7), PPERN21, PPERN28 (15), PPERN36, PPERN37	PPERNO2 (23), PPERN14, PPERN15	En este trabajo	KP685521↗ KP685537
	Madrid (39)	CICAMT9-1, CICAMT9-2, CICAMT9-4, CICAMT9-5, CICAMT9-6, CICAMT9-7, CICAMT9-8, CICAMT9-9, CICAMT9-10, CICAMT9-11, CICAMT9-13, CICAMT9-14, CICAMT9-15, CICAMT9-16, CICAMT9-17, CICAMT9-18, CICAMT9-19, CICAMT9-20, F1T2, F1T3, F1T4, F1T7, F1T9, F2T2, F2T3, F2T4, F2T7, F3T3, F3T4, F3T7, F4T3, F4T7, F5T3, F5T7, F6T7, F8T7, F9T7, F10T7, F11T7	PPERNO1 (36), PPERN23, PPERN24, PPERN25	PPERNO2 (36), PPERNO9, PPERNO10, PPERNO11	En este trabajo	KP685435↗ KP685452

Tabla 43. Continuación. Relación de las secuencias del Conjunto 1 ($n=155$). Número de especímenes, origen y códigos de acceso de la colección de flebotomos para este estudio.

Especie (No)	Localidad	Código de Identificación ^a	Haplotipos		Referencia	GenBank ^b
			COI	CYTB		
<i>P. ariasi</i> (n=12)	Burgos (12)	AGEST9-3, AGEST9-6, AGEST9-7, AGEST9-9, AGEST9-10, AGEST9-13, AGEST9-14, AGEST9-15, AGEST9-16, AGEST9-17, AGEST9-18, AGEST9-19,	PARIA02 (2), PARIA03, PARIA04 (8), PARIA05	PARIA08 (12)	En este trabajo	KP685539↯ KP685550
<i>P. papatasi</i> (n= 2)	Murcia (2)	MORT1-2, MORT1-4	PPAPA10 (2)	PPAPA08 (2)		KP702248↯ KP702249
<i>S. minuta</i> (n= 15)	Sevilla (10)	19CAST1-1, 19CAST1-2, 19CAST1-5, 19CAST1-8, 19CAST1-9, 19CAST1-10, 19CAST1-15, 19CAST1-17, 19CAST1-19, 19CAST1-Smi	SMINU-12, SMINU-13 (3), SMINU-14↯ SMINU-20	SMINU06 (6), SMINU07, SMINU08, SMINU09 (2)	En este trabajo	KP702251↯ KP702260
	Cuenca (1)	BUE1	SMINU-11	SMINU05	En este trabajo	KP702250
	Madrid (1)	F7T7	SMINU-21	SMINU06	En este trabajo	KP702261
	Murcia (3)	MORT1-3, MORT1-5, MORT1-8	SMINU-16, SMINU-22, SMINU-23	SMINU10, SMINU11, SMINU12	En este trabajo	KP702262↯ KP702264

^a Número de identificación de los especímenes solo para uso interno de la colección

^b Número de acceso al GenBank únicamente para secuencias de CYTB

↯ indica continuidad en el número (en haplotipos y No. de acceso a Genbank)

(No.) en paréntesis el número de haplotipos cuando estaba representado por más de una secuencia.

3.2. Representación geográfica de las secuencias obtenidas para el Conjunto 2

Tras la búsqueda bibliográfica se realizó un mapa para mostrar la distribución geográfica de los flebotomos de esta colección y la descarga mediante la base de datos del Genbank de cada una de las secuencias correspondientes. La Figura 53, compara los resultados obtenidos, respecto al gen *coi* se representan 133 secuencias de 15 especies de *Phlebotomus* obtenidos en 8 países, mientras que para el gen *cytb* se obtuvieron 336 secuencias de 18 especies localizadas en 21 países (Véase Tabla 45 y Tabla 48).

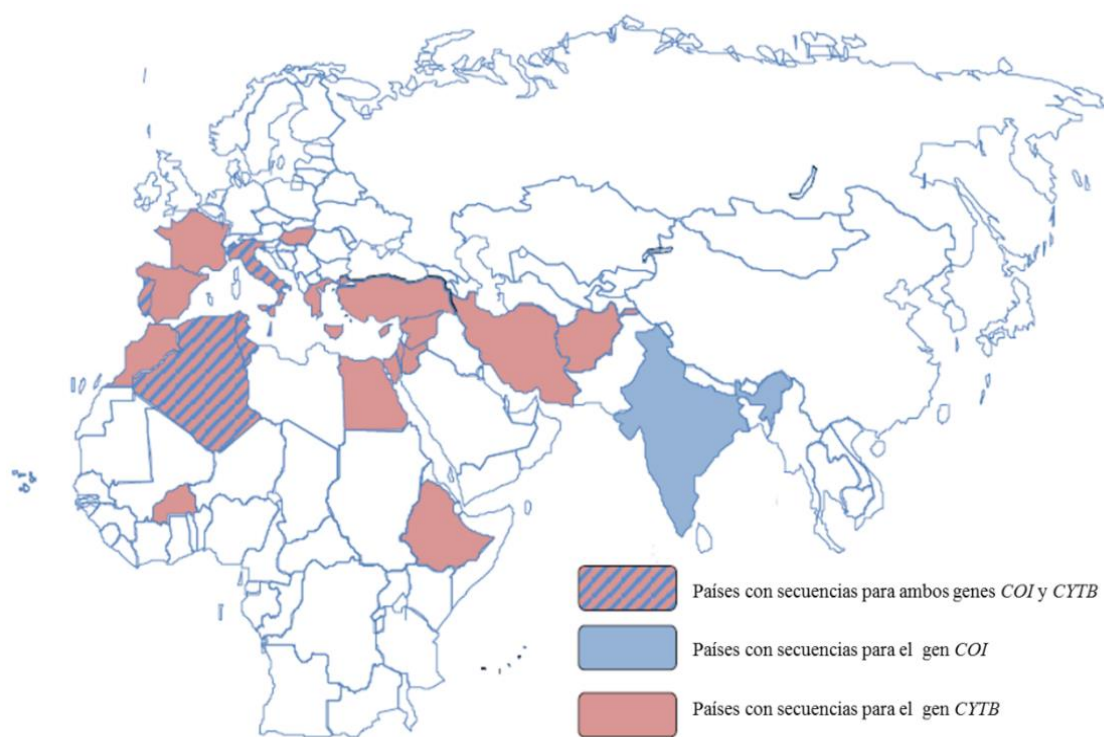


Figura 53. Geolocalización de las secuencias de la Colección 2. En color rosa, los países que correspondientes a las secuencias disponibles del gen *cytb*; en azul los correspondientes a las secuencias disponibles del *coi*. En líneas combinadas, países de los que se dispone de los dos tipos de secuencia.

3.3. Características del gen *coi* como marcador molecular

3.3.1. Alineamiento y asignación de haplotipos en las secuencias *coi*

El alineamiento múltiple estaba compuesto por un total de 288 secuencias (Conjunto 1, $n = 155$ + Conjunto 2, $n = 133$), y se realizó utilizando como referencia la JN036765, nucleótidos 38 al 658, obteniendo una secuencia consenso de 620 a 630 nt según la especie. Entre este grupo, se encontraron 119 haplotipos (h), una diversidad haplotípica (H_d) = 0,9992 y nucleotídica (P_i) = 0,12598 (Tabla 44). La variación identificada se apoya en 374 sitios conservados y 247 sitios polimórficos (S), de los cuales el 87% (214) eran sitios informativos de parsimonia (SIP), y el 13% (33) eran polimorfismos de nucleótido único (SNP). La composición nucleotídica promedio fue: T (28,9%), A (36,2%), G (17,7%), C (17,2%). En la Tabla 44 se sintetizan los parámetros de variabilidad para este gen.

Tabla 44. Características de las 288 secuencias incluidas en el estudio del gen *coi*. Se describen haplotipos por especie (h), número de sitios polimórficos (S), número de polimorfismos de nucleótido único (SNP), número de sitios informativos de parsimonia (SIP), número total de mutaciones (Eta).

Parámetros de variabilidad en COI								
Especies	No. Secuencias	nt ^a	h	S	SNP	SIP	Eta	trs-trv
<i>P. perniciosus</i>	169	621	38	44	28	16	44	37 - 7
<i>P. longicuspis</i>	17	621	7	18	8	10	18	17 - 1
<i>P. ariasi</i>	15	621	5	50	3	47	52	39 - 13
<i>P. papatasi</i>	11	621	10	21	10	11	21	18 - 3
<i>P. sergenti</i>	4	621	3	44	43	1	45	40 - 5
<i>P. perfiliewi</i>	5	630	3	4	4	0	4	4 - 0
<i>P. alexandri</i>	14	625	12	15	11	4	15	12 - 3
<i>P. chadlii</i>	2	625	2	2	2	0	2	2 - 0
<i>P. riouxi</i>	3	622	2	2	2	0	2	2 - 0
<i>P. bergeroti</i>	1	621	1	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
<i>P. chabaudi</i>	4	621	2	1	1	0	1	1 - 0
<i>S. minuta</i>	25	621	23	44	15	29	49	38 - 11
<i>S. antennata</i>	4	621	3	10	9	1	10	10 - 0
<i>S. fallax</i>	10	621	6	10	9	1	10	8 - 2
<i>S. clydei</i>	4	621	2	14	14	0	14	13 - 1
Total	288	621	119	279	159	120	287	241-46

^a nt: Número de nucleótidos en la secuencia.

n.a: no aplica debido al número de secuencias

Las diferencias nucleotídicas mostraron ciertas particularidades en la asignación de haplotipos, entre las más destacadas encontramos que:

- De las 169 secuencias analizadas de *P. perniciosus* se encontraron 38 haplotipos, en los cuales observamos 44 sitios polimórficos. El haplotipo más común fue PPERN-01 con 73 especímenes aislados en la Península Ibérica con ejemplares de ambos países (España y Portugal), seguido de 16 secuencias del haplotipo PPERN-28 observado únicamente en individuos de España. Todos los países presentaron haplotipos únicos y otros fueron compartidos entre regiones como el PPERN-09 observado en Argelia, Túnez e Italia. La distribución y frecuencia del resto de los haplotipos se muestran en la Tabla 45.
- El mayor número de cambios se observó en las secuencias de *P. ariasi* ($n= 15$) con 5 haplotipos, que contenían 50 sitios polimórficos y 52 mutaciones. De ellos, predominaba el haplotipo PARIA04 en 8 de las 15 secuencias analizadas, todos ellos encontrados en España. Es de resaltar que 12 de estas secuencias se han descubierto en este trabajo, lo que indica que la cantidad de secuencias disponibles en el Genbank aún es limitada.
- Las 4 secuencias de *P. sergenti* se distribuyen en 3 haplotipos, en los que encontramos 44 sitios polimórficos con 45 mutaciones.
- Las secuencias de *coi* de *P. papatasi* muestran una gran variabilidad; en las 11 secuencias analizadas se encontraron 10 haplotipos (Tabla 44). Ocho de las secuencias provenían de ejemplares de India y los dos restantes fueron generadas en este trabajo a partir de especímenes capturados en España. Decidimos incluir secuencias de especímenes de India, ya que eran las únicas representando a esta especie, que por otra parte es frecuente en la cuenca mediterránea y países de Oriente Medio.
- Las 5 secuencias de *P. perfiliewi* muestran 3 haplotipos, el más frecuente es el PPERF01. *P. perfiliewi* es una especie capaz de transmitir *L. infantum*. Existen reportes de la extensa presencia de este vector desde Argelia, pasando por Túnez, Grecia, Rumania, hasta Israel y Palestina.
- *P. alexandri* parece ser un grupo muy heterogéneo, de las 14 secuencias analizadas (únicamente de Argelia) observamos 12 haplotipos, y solo 2 de ellos se repiten, el PALEX05 (3/14) y PALEX04 (2/14) (Tabla 45).

- *P. alexandri* es capaz de transmitir 2 especies de *Leishmania*, *L. infantum* y *L. donovani*. Su principal ubicación está en el continente asiático, específicamente en China, no obstante, se ha descrito en países de Oriente Medio como Irak y Omán y Turquía, por lo que el riesgo de introducción en países cercanos debe tenerse en cuenta.
- Nuestros resultados demuestran que el grupo de secuencias de *S. minuta* presenta una alta tasa de mutación, y por tanto posee una considerable variabilidad intraespecífica. Hemos descrito 23 haplotipos en 25 secuencias, descubriendo 44 sitios polimórficos con un total de 45 mutaciones (40 transiciones y 5 transversiones). Y un resultado similar en *S. clydei* a pesar del menor número de secuencias incluidas en este estudio (n= 4), esta especie presenta 3 haplotipos, con 10 sitios polimórficos (10 transiciones y ninguna transversión) (Tabla 45). La especie que menos sustituciones nucleotídicas presenta es *P. chabaudi* (n= 4), que tan solo presentan un cambio (transición) (Tabla 45).

Tabla 45. Origen geográfico, haplotipos *coi* e información de acceso de las 133 secuencias del gen *coi* de las 15 especies de flebótomos obtenidas del Genbank.

Especie (No.)	País (No.)	No. Acceso Genbank	Haplotipos (No.)	Referencia
<i>P. perniciosus</i> (n = 43)	Argelia (19)	KJ481143, KJ481136, KJ481154, KJ481153, KJ481152, KJ481149, KJ481147, KJ481144, KJ481141, KJ481138, KJ481151, KJ481148, KJ481145, KJ481140, KJ481139, KJ481137, KJ481150, KJ481146, KJ481142	PPERN07 → PPERN09 (9), PPERN13 → PPERN20	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
	Italia (3)	JN036771, JN036769, JN036770	PPERN09 (3)	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	Malta (1)	JN036772	PPERN13	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	Portugal (2)	JN036765 , JN036766	PPERN01 (2)	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	Túnez (17)	JN036792, JN036794, JN036800, JN036806, JN036802, JN036807, JN036799, JN036791, JN036797, JN036790, JN036781, JN036788, JN036779, JN036789, JN036785, JN036782, JN036784	PPERN02 (3), PPERN03 (2), PPERN04 (3), PPERN05, PPERN09 (4)	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	n.d (1)	JN036773	PPERN08	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. longicuspis</i> (n = 17)	Argelia (15)	JN036809, KJ481159, KJ481162, KJ481160, KJ481168, KJ481167, KJ481166, KJ481165, KJ481164, KJ481161, KJ481158, KJ481157, KJ481156 KJ481155, KJ481163	PLONG02 (11) PLONG04 → PLONG07	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012) (Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
	Túnez (2)	JN036810, JN036808	PLONG01, PLONG03	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. ariasi</i> (n = 3)	Argelia (3)	KJ481171, KJ481170, KJ481169	PARIA01 (3)	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. papatasi</i> (n = 9)	India (8)	JN172080, JN172083, JN172077, JN172084, JN172082, JN172076, JN172079, JN172078	PPAPA01 → PPAPA08	(N. P. Kumar <i>et al.</i> , 2012)
	n.d (1)	JX105037	PPAPA09	(Abbasi & Warburg, 2012)

n.d: No existen datos; d.n.p: datos no publicados en un manuscrito, la información que obtenemos es únicamente extraída de la ficha técnica del Genbank

→ indica continuidad en el número de haplotipo; en **negrita** se indica la secuencia de referencia empleada para el alineamiento multiple.

Tabla 45. Continuación. Origen geográfico, haplotipos coi e información de acceso de las 133 secuencias del gen coi de las 15 especies de flebótomos obtenidas del Genbank.

Especie (No.)	País (No.)	No. Acceso Genbank	Haplotipos (No.)	Referencia
<i>P. sergenti</i> (n = 4)	Túnez (2)	JN036817, FJ196442	PSERG01, PSERG03	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	Israel? (1)	JX105039	PSERG02	(Abbasi & Warburg, 2012) (Boudabous <i>et al.</i> , 2009)
	Colonia de Laboratorio (1)	KC755398	PSERG02	(Florin & Rebollar-Tellez, 2013)
<i>P. perfiliewi</i> (n = 5)	Argelia (5)	KJ481176, KJ481175, KJ481081, KJ481080, KJ481177	PPERF01 (3), PPERF02, PPERF03	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. alexandri</i> (n = 14)	Argelia (14)	KJ481095, KJ481091, KJ481090, KJ481088, KJ481085, KJ481093, KJ481089, KJ481087, KJ481086, KJ481083, KJ481082, KJ481094, KJ481092, KJ481084	PALEX01 ↯ PALEX03, PALEX04 (2), PALEX05 (3), PALEX06 ↯ PALEX12	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. chadlii</i> (n = 2)	Argelia (2)	KJ499904, KJ499905	PCHAD01, PCHAD02	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. riouxi</i> (n = 3)	Túnez (3)	FJ196403, FJ196406, FJ196405	PRIOU01 (2), PRIOU02	(Boudabous <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. bergeroti</i> (n = 1)	Argelia (1)	KJ481079	PBERG01	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. chabaudi</i> (n = 4)	Argelia (1)	KJ481172	PCHAB02	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
	Túnez (3)	FJ196434, FJ196431, FJ196432	PCHAB01 (3)	(Boudabous <i>et al.</i> , 2009)
<i>S. minuta</i> (n = 10)	Argelia (9)	KJ481115, KJ481117, KJ481181, KJ481120, KJ481118, KJ481114, KJ481121, KJ481180, KJ481122	SMINU01 ↯ SMINU04, SMINU06 ↯ SMINU10	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
	Túnez (1)	JN036818	SMINU05	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
<i>S. fallax</i> (n = 10)	Argelia (9)	KJ481104, KJ481100, KJ481098, KJ481105, KJ481103, KJ481102, KJ481101, KJ481099, KJ481097	SFALL01, SFALL02, SFALL03 (5), SFALL04, SFALL05	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
	Túnez (1)	JN036819	SFALL06	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
<i>S. antennata</i> (n = 4)	Argelia (4)	KJ481113, KJ481112, KJ481111, KJ481110	SANTE01, SANTE02 (2), SANTE03	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
<i>S. clydei</i> (n = 4)	Argelia (4)	KJ481135, KJ481179, KJ481178, KJ481134	SCLYD01, SCLYD02 (3)	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)

n.d: No existen datos; d.n.p: datos no publicados en un manuscrito, la información que obtenemos es únicamente extraída de la ficha técnica del Genbank

↯ indica continuidad en el número de haplotipo; en **negrita** se indica la secuencia de referencia empleada para el alineamiento multiple.

3.3.2. Análisis de distancias genéticas del gen *coi*

A continuación, se analizó la variabilidad genética intra e interespecífica entre las secuencias del gen *coi*, tomando los datos de los 119 haplotipos. La distancia intraespecífica se calculó partiendo de que las secuencias analizadas tienen más de un individuo por especie secuenciado ($n \geq 2$). Se construyeron las matrices de similitud/diferencias utilizando los modelos de sustitución de K2P, JC y *p-distance* generando los tres resultados similares (en esta memoria se presentan los datos obtenidos con el modelo K2P (Tabla 46).

Las distancias genéticas, indicaron valores K2P a nivel **intra-especie** entre 0,0-8,2%. En algunas especies se observaron valores muy bajos de divergencia $\leq 1\%$ en *P. perfiliewi*, *P. alexandri*, *P. chadli*, *P. chabaudi* y *S. fallax*. En otras una distancia entre el 1 y 2%, como es el caso de *P. perniciosus*, *P. longicuspis*, *S. clydei*, *P. papatasi* y *S. antennata*. Sorprendentemente algunas especies se caracterizaron por su alta variabilidad, alrededor del 8% en *P. ariasi* y *P. sergenti* y 4% en *S. minuta* (Tabla 49 y Tabla 50).

La divergencia entre especies resultó entre el 7–25% (0,070–0,250). Las distancias genéticas **inter-específicas** revelaron que *P. chadli* y *P. papatasi* son las especies más divergentes de flebótomos, las cuales presentan valores de distancia entre (0,231–0,249) 23 al 25 %, seguidas de *P. ariasi* y *P. papatasi* (0,188-0,250) 18–25%. Por otra parte, las especies más cercanas genéticamente fueron *P. perniciosus* y *P. longicuspis* con valores de (0,070); *P. papatasi* con *P. bergeroti* con una distancia máxima de 0,058 y *P. perniciosus* con *P. perfiliewi* (0,080) (Tabla 46).

Tabla 46. Distancias genéticas en el gen *coi* en 15 especies diferentes de los subgéneros *Phlebotomus* y *Sergetomyia* siguiendo el modelo K2P. Nótese los valores de divergencia más altos y más bajos indicados en negrita.

Distancias genéticas interespecíficas COI														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>P. perniciosus</i>														
2 <i>P. longicuspis</i>	0,070													
3 <i>P. ariasi</i>	0,207	0,215												
4 <i>P. papatasi</i>	0,191	0,177	0,250											
5 <i>P. sergenti</i>	0,202	0,218	0,242	0,210										
6 <i>P. perfiliewi</i>	0,084	0,102	0,188	0,197	0,206									
7 <i>P. alexandri</i>	0,151	0,152	0,181	0,171	0,171	0,156								
8 <i>P. chadlii</i>	0,195	0,189	0,082	0,249	0,228	0,171	0,180							
9 <i>P. riouxi</i>	0,186	0,179	0,174	0,231	0,208	0,178	0,171	0,164						
10 <i>P. bergeroti</i>	0,167	0,159	-	0,058	0,181	0,175	0,135	0,204						
11 <i>P. chabaudi</i>	0,186	0,158	0,190	0,214	0,175	0,173	0,161	0,194	0,202	0,191				
12 <i>S. minuta</i>	0,250	0,238	0,238	0,251	0,250	0,214	0,226	0,229	0,195	0,214	0,224			
13 <i>S. antennata</i>	0,185	0,190	0,221	0,220	0,203	0,194	0,212	0,224	0,206	0,203	0,213	0,202		
14 <i>S. fallax</i>	0,204	0,209	0,251	0,242	0,236	0,239	0,230	0,257	0,241	0,221	0,244	0,210	0,177	
15 <i>S. clydei</i>	0,231	0,239	0,238	0,220	0,241	0,224	0,234	0,244	0,221	0,204	0,227	0,194	0,181	0,231

-: no se determinó debido a que solamente estaba disponible una secuencia.

3.4. Características del gen *cytb* como marcador molecular

3.4.1. Alineamiento y asignación de haplotipos en las secuencias de la región parcial del gen *cytb*

La secuencia amplificada del gen *cytb* tenía un tamaño que vario entre 472 -482 pb según la especie. Los alineamientos múltiples de las secuencias del *cytb* de las Colecciones 1 y 2 se realizaron utilizando como referencia la secuencia JF 766956 (nucleótidos 451 al 715), generando un alineamiento de 265 nt en todas las especies. En total, se obtuvieron 491 secuencias de 18 especies de los Subgéneros *Phlebotomus* y *Sergentomyia*. El alineamiento múltiple de las secuencias *cytb* estaba compuesto por 115 secuencias de la Colección 1 y 336 secuencias de la Colección 2. La composición nucleotídica promedio de las secuencias *cytb* fue: T (42,6%), A (15,3%), G (32,8%), C (9,3%). En este grupo, se observaron 175 haplotipos, los cuales presentaron 147 sitios polimórficos, 119 fueron informativos y 28 SNPs. A pesar del tamaño reducido de la secuencia (265 nt) en comparación con *coi*, el número de sitios polimórficos totales y sitios informativos de parsimonia fue mayor en las secuencias *cytb*. Estos datos fueron corroborados por los índices de diversidad nucleotídica (Pi: 0,15293) y haplotípica (Hd= 0.9997). La Tabla 47 muestra detalles adicionales sobre los resultados del análisis de este gen.

Tabla 47. Características de las 491 secuencias incluidas en el estudio del gen *cytb*. Se describen número de secuencias y haplotipos por especie (h), seguido del número de sitios polimórficos (S), número de polimorfismos de un único nucleótido (SNP), número de sitios informativos de parsimonia (SIP), número total de mutaciones (Eta).

Parámetros de variabilidad en CYTB							
Especies	No. Secuencias	nt ^a	h	S	SNP	SIP	Eta ^f
<i>P. perniciosus</i>	152	265	15	17	13	4	17
<i>P. longicuspis</i>	4	265	2	13	13	0	13
<i>P. ariasi</i>	157	265	64	51	31	20	58
<i>P. papatasi</i>	32	265	13	15	12	3	17
<i>P. sergenti</i>	15	265	10	80	54	26	88
<i>P. perfiliewi</i>	21	265	10	20	4	16	20
<i>P. alexandri</i>	14	265	6	5	4	1	5
<i>P. chadlii</i>	2	265	2	1	1	0	1
<i>P. riouxii</i>	13	265	10	20	9	11	20
<i>P. bergeroti</i>	2	265	2	2	2	0	2
<i>P. chabaudi</i>	27	265	11	33	12	21	36
<i>P. neglectus</i>	12	265	6	11	8	3	11
<i>P. tobbi</i>	4	265	3	3	3	0	3
<i>P. balcanicus</i>	2	265	2	8	8	0	8
<i>P. mascittii</i>	1	265	1	n.a	n.a	n.a	n.a
<i>P. langeroni</i>	2	265	2	1	1	0	1
<i>S. minuta</i>	21	265	12	24	13	11	25
<i>S. fallax</i>	10	265	4	3	2	1	3
Total	491	265	175	147	28	119	227

^a nt: Número de nucleótidos en la secuencia; n.a: no aplica debido al número de secuencias

Los detalles sobre la composición de haplotipos- *cytb* en las diferentes especies se exponen en las Tabla 48 y Tabla 47. Los resultados más representativos de los haplotipos asignados según el gen *cytb* se proporcionan a continuación:

- De las 152 secuencias analizadas en *P. perniciosus*, encontramos 15 haplotipos. De estos, los mas comunes fueron: la variante PPERN-02 observado en 123 ejemplares de ambos países de la Península Ibérica, seguido de PPERN-01 observado en 12 especímenes de Italia (5/152), Malta (3/152) y Túnez (3/152) y una sin referente geográfico.
- Las 157 secuencias anlizadas para *P. ariasi*, mostraron una elevada variabilidad nucleotídica, la cual queda reflejada en 64 haplotipos distintos. De estos, el más frecuente fue el haplotipo PARIA-01 (43/157) hallado en Francia (40/157) y España (3/157), seguido del haplotipo PARIA-08 (17/157) encontrado en España (15/17) y en Portugal (2/17).
- Las secuencias de *P. papatasi* presentan gran variabilidad intraespecífica, de las 32 secuencias analizadas, observamos 13 haplotipos. De estos, el más común fue le haplotipo PPAPA01 (11/32), compartido entre diferentes países de Oriente Medio (Irán, Palestina Siria y Turquía) e Italia.

Tabla 48. Origen geográfico, haplotipos *cytb* e información de acceso de las 336 secuencias de 18 especies de flebotomos obtenidas del Genbank.

Especie (No.)	País (No.)	No. Acceso Genbank	Haplotipos (No.)	Referencia
<i>P. perniciosus</i> (n = 26)	España (1)	JN036735	PPERN02	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	Italia (6)	JF766954, JF766955, JF766956 , JF766957, JF766958, JN036737	PPERN01 (5), PPERN08	(Latrofa <i>et al.</i> , 2011) (Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	Malta (3)	JN036724, JN036725, JN036727	PPERN01 (3)	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	Portugal (6)	JN036729, JN036730, JN036731, JN036732, JN036733, JN036734	PPERN03 (3), PPERN02 (3)	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	Túnez (9)	JN036728, JN036738, JN036742, JN036743, JN036744, JN036745, JN036748, JN036754, JN036755	PPERN01 (3), PPERN04, PPERN05 (3), PPERN06, PPERN07	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	n.d (1)	U94472	PPERN01	(Esseghir <i>et al.</i> , 1997)
<i>P. longicuspis</i> (n = 4)	Marruecos (1)	HM131126	PLONG01	(Franco <i>et al.</i> , 2010)
	Burkina Faso (1)	AY700012	PLONG02	(Depaquit <i>et al.</i> , 2004)
	Túnez (1)	JN036758	PLONG02	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
	n.d (1)	JN036757	PLONG02	(Boudabous <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. ariasi</i> (n = 145)	Argelia (1)	HM131125	PARIA31	(Franco <i>et al.</i> , 2010)
	España (28)	HM131081, HM131082, HM131083, HM131084, HM131085, HM131091, HM131092, HM131093, HM131094, HM131095, HM131097, HM131098, HM131099, HM131102, HM131107, HM131113, HM131114, HM131115, HM131116, HM131117, HM131118, HM131119, HM131120, HM131122, HM131123, HQ023316, HM131096A, HM131096B	PARIA01 (3), PARIA03, PARIA04, PARIA05 (2), PARIA06, PARIA07 (2), PARIA08 (3), PARIA09, PARIA14 -PARIA17, PARIA19, PARIA20, PARIA22, PARIA23 (2), PARIA28 -PARIA30, PARIA36	(Franco <i>et al.</i> , 2010) (Mahamdallie <i>et al.</i> , 2011)

Tabla 48. Continuación. Origen geográfico, haplotipos *cytb* e información de acceso de las 336 secuencias de 18 especies de flebotomos obtenidas del Genbank.

Especie (No.)	País (No.)	No. Acceso Genbank	Haplotipos (No.)	Referencia
<i>P. ariasi</i> (n= 145)	Francia	AF161194, AF161195, HM131100, HM131101, HM131103, HM131104, HM131105, HM131106, HM131109, HM131110, HM131111, HM131112A, HM131112B, HQ023290, HQ023291, HQ023292, HQ023294, HQ023295, HQ023296, HQ023297, HQ023298, HQ023299, HQ023300, HQ023301, HQ023302, HQ023303, HQ023304, HQ023305, HQ023306, HQ023307, HQ023308, HQ023309, HQ023310, HQ023311, HQ023312, HQ023313, HQ023314, HQ023315, HQ023317, HQ023318, HQ023319, HQ023320, HQ023321, HQ023322, HQ023323, HQ023324, HQ023325, HQ023326, HQ023327, HQ023328, HQ023329, HQ023330, HQ023331, HQ023332, HQ023333, HQ023334, HQ023335, HQ023336, HQ023337, HQ023338, HQ023340, HQ023341, HQ023347, HQ023348, HQ023349, HQ023350, HQ023351, HQ023352, HQ023353, HQ023354, HQ023355, HQ023356, HQ023357, HQ023358, HQ023359, HQ023360, HQ023361, HQ023362, HQ023363, HQ023364, HQ023365, HQ023366, HQ023367, HQ023368, HQ023369, HQ023370, HQ023289, HQ023393	PARIA01 (40), PARIA02 (1), PARIA05, PARIA09↯ PARIA12, PARIA13 (4), PARIA17 (2), PARIA18, PARIA20 (11), PARIA21 (2), PARIA33, PARIA39, PARIA40 (2), PARIA41↯ PARIA43, PARIA46↯ PARIA48, PARIA50↯ PARIA56, PARIA58↯ PARIA62, PARIA64	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000) (Franco <i>et al.</i> , 2010) (Mahamdallie <i>et al.</i> , 2011)
	Marruecos (10)	HQ023371, HQ023372, HQ023373, HQ023374, HQ023375, HQ023376, HQ023377, HQ023378, HQ023379, HQ023380	PARIA35, PARIA36 (4), PARIA37, PARIA38, PARIA44, PARIA45, PARIA63	(Mahamdallie <i>et al.</i> , 2011)
	Portugal (17)	HM131086A, HM131086B, HM131108A, HM131087, HM131088, HM131089, HM131090, HM131108D, HM131121, HM131124, HQ023342, HQ023343, HQ023344, HQ023345, HQ023346, HM131108B, HM131108C,	PARIA01, PARIA08 (2), PARIA19 (3), PARIA23, PARIA24 (2), PARIA25↯ PARIA27, PARIA32, PARIA34, PARIA37, PARIA57, PARIA61	(Franco <i>et al.</i> , 2010) (Mahamdallie <i>et al.</i> , 2011)
	Túnez (1)	AF161196	PARIA49	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000)
<i>P. papatasi</i> (n= 30)	Afganistán (4)	HM803194, HM803210, HM803211, HM803212	PPAPA01, PPAPA02, PPAPA04, PPAPA11	(Krüger <i>et al.</i> , 2011)
	Chipre/Túnez? (1)	U94475	PPAPA01	(Esseghir <i>et al.</i> , 1997)
	Egipto (5)	DQ381816, DQ381817, DQ381818, DQ381819, DQ381820	PPAPA01, PPAPA04 (2), PPAPA12, PPAPA13	(Hamarsheh <i>et al.</i> , 2007)
	Irán (1)	AY378318	PPAPA01	(Parvizi <i>et al.</i> , 2003)
	Israel (3)	DQ381821, DQ381822, DQ381823	PPAPA07 (2), PPAPA03	(Krüger <i>et al.</i> , 2011) (Hamarsheh <i>et al.</i> , 2007)
	Italia (8)	DQ381829, DQ381830, DQ381831, HM992926, HM992927, JF766973, JF766974, JF766975	PPAPA01 (4), PPAPA02, PPAPA09 (2), PPAPA10	(Hamarsheh <i>et al.</i> , 2007) (Krüger <i>et al.</i> , 2011) (Latrofa <i>et al.</i> , 2011)
	Jordania (1)	DQ381828	PPAPA03	(Hamarsheh <i>et al.</i> , 2007)
	Palestina (3)	DQ381824, DQ381826, DQ381827	PPAPA01, PPAPA03, PPAPA06	(Hamarsheh <i>et al.</i> , 2007)
	Siria (2)	DQ381832, DQ381833	PPAPA01, PPAPA07	(Hamarsheh <i>et al.</i> , 2007)
	Turquía (2)	DQ381834, DQ381835	PPAPA01, PPAPA05	(Hamarsheh <i>et al.</i> , 2007)

n.d: No existen datos; d.n.p: datos no publicados en un manuscrito, la información que obtenemos es únicamente extraída de la ficha técnica del Genbank.; ↯ indica continuidad en el número de haplotipo.

Tabla 48. Continuación. Origen geográfico, haplotipos cytb e información de acceso a las 336 secuencias de 18 especies de flebotomos obtenidas del Genbank.

Especie (No.)	País (No.)	No. Acceso Genbank	Haplotipos (No.)	Referencia
<i>P. sergenti</i> (n = 15)	Argelia (12)	KJ480960, KJ480961, KJ480962, KJ480963, KJ480964, KJ480965, KJ480966, KJ480967, KJ480968, KJ480969, KJ480971, KJ480972	PSERG01, PSERG02 (2), PSERG03, PSERG04 (4), PSERG06, PSERG07, PSERG08 (2), PSERG09, PSERG10	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
	Irán (2)	DQ840374, DQ840377	PSERG01, PSERG03	(Moin-vaziri <i>et al.</i> , 2007)
	Túnez (1)	AF161216	PSERG05	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000)
<i>P. perfiliewi</i> (n = 21)	Argelia (2)	KJ480976, KJ480975	PPERF07 (2)	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
	Grecia (1)	AF161201	PPERF05	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000)
	Irán (6)	GQ169338, GQ169339, GQ169340, GQ169341, GQ169342, GQ169343	PPERF06 (6)	(M.A Oshaghi <i>et al.</i> , 2009)
	Italia (8)	JF766965, JF766966, JF766967, JF766968, JF766969, JF766970, JF766971, JF766972	PPERF01, PPERF02 (5), PPERF03, PPERF04	(Latrofa <i>et al.</i> , 2011)
	Túnez (4)	AF161197, AF161198, AF161199, AF161200	PPERF07↗ PPERF10	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000)
<i>P. alexandri</i> (n = 14)	Argelia (14)	KJ480977, KJ480978, KJ480979, KJ480980, KJ480981, KJ480982, KJ480983, KJ480984, KJ480985, KJ480986, KJ480987, KJ480988, KJ480989, KJ480990	PALEX01, PALEX02, PALEX03 (6), PALEX04, PALEX05, PALEX06	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. chadlii</i> (n = 2)		HM131079, HM131080	PCHAD01, PCHAD02	(Franco <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. riouxi</i> (n = 13)	Argelia (9)	EU935815, EU935816, EU935817, EU935818, EU935819, EU935820, EU935821, EU935822, EU935823	PRI0U01, PRI0U06 (4), PRI0U07, PRI0U08, PRI0U09, PRI0U10	(Bounamous <i>et al.</i> , 2008)
	Túnez (4)	EU935824, EU935825, EU935826, EU935827	PRI0U02, PRI0U03, PRI0U04, PRI0U05	(Bounamous <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. bergeroti</i> (n = 2)	Argelia (1)	KJ480973	PBERG02	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
	Etiopia	AF161213	PBERG01	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000)
	Argelia (1)	KJ480974	PCHAB02	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. chabaudi</i> (n = 27)	Túnez (26)	AF161217, KC433541, KC433542, KC433543, KC433544, KC433545, KC433546, KC433548, KC433547, KC478292, KC478293, KC478294, KC478295, KC478296, KC478297, KC478298, KC478299, KC478300, KC478301, KC478302, KC478303, KC478304, KC478305, KC478306, KC478307, KC478308	PCHAB01 (2), PCHAB03, PCHAB04 (2), PCHAB05 (2), PCHAB06 (2), PCHAB07 (10), PCHAB08 (2), PCHAB09 (3), PCHAB10 (1), PCHAB11 (1)	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000) (Tabbabi <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. neglectus</i> (n = 12)	Grecia (6)	AF161188, AF161189, AF161190, AF161191, AF161192, AF161193	PNEGL01 (2), PNEGL02 (2), PBEGLO3 (2)	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000)
	Hungría (1)	HQ023286	PNEGL04	(Mahamdallie <i>et al.</i> , 2011)
	Italia (5)	JF766959, JF766960, JF766961, JF766963, JF766964	PNEGL02, PNEGL05 (3), PNEGL06	(Latrofa <i>et al.</i> , 2011)

n.d: No existen datos; d.n.p: datos no publicados en un manuscrito, la información que obtenemos es únicamente extraída de la ficha técnica del Genbank.

↗ indica continuidad en el número de haplotipo

En **negrita** y subrayado se presenta la secuencia referencia empleada para el análisis

Tabla 48. Continuación. Origen geográfico, haplotipos *cytb* e información de acceso a las 336 secuencias de 18 especies de flebotomos obtenidas del Genbank.

Especie (No.)	País (No.)	No. Acceso Genbank	Haplotipos (No.)	Referencia
<i>P. tobbi</i> (n = 4)	Grecia (4)	AF161209, AF161210, AF161211, AF161212	PTOBB01 (2), PTOBB02, PTOBB03	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000)
<i>P. balcanicus</i> (n = 2)	Irán (2)	JX885983, JX885989	PBALC01, PBALC02	(Zahraei-ramazani <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. mascittii</i> (n = 1)	Francia (1)	HQ023281	PMASC01	(Mahamdallie <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. langeroni</i> (n = 2)	Egipto (1)	AF161208	PLANG02	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000)
	Túnez (1)	AF161207	PLANG01	(Esseghir <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. minuta</i> (n = 6)	Italia (6)	JF766976, JF766977, JF766978, JF766979, JF766980, JF766981	SMINU01, SMINU02, SMINU03 (3), SMINU04	(Latrofa <i>et al.</i> , 2011)
<i>S. fallax</i> (n = 10)	Argelia (10)	KJ480991, KJ480992, KJ480993, KJ480994, KJ480995, KJ480996, KJ480997, KJ480998, KJ480999, KJ481000	SFAL01 (6), SFAL02, SFAL03 (2), SFAL04	(Bounamous <i>et al.</i> , 2014)

n.d: No existen datos; d.n.p: datos no publicados en un manuscrito, la información que obtenemos es únicamente extraída de la ficha técnica del Genbank.

↗ indica continuidad en el número de haplotipo

En **negrita** y subrayado se presenta la secuencia referencia empleada para el análisis

3.4.2. Análisis de las distancias genéticas en *cytb*

Las distancias genéticas, indicaron valores **intra-especie** entre 0–12 %. Los valores entre 0–1,5% se observaron en *S. fallax*, *P. alexandri*, *P. bergeroti*, *P. tobbi*, *P. chadlii*; 2–3% en *P. perniciosus*, *P. papatasi* y *P. balcanicus*; y 4–6% en *P. neglectus*, *P. riouxi*, *P. longicuspis*, *P. ariasi* y *S. minuta*; 7–12% en *P. perfiliewi* y *P. chabaudi*. Además, se observaron haplotipos muy divergentes en *P. sergenti* en quienes la distancia fluctuó entre 0,0–44,4 % superando el valor considerado como específico (Tabla 49 y Tabla 50).

Los valores de distancia **inter-específicas** para *cytb* variaron entre 5 % (*P. papatasi* y *P. bergeroti*), a 51% (*P. ariasi* y *P. sergenti*). La especie más divergentes fue *P. sergenti* con valores de 0,360–0,507 si se le compara con las demás especies del género *Phlebotomus*. Seguido por *P. mascitti*, *P. chadlii* y *P. balcanicus*, con distancias máximas de hasta un 45% respecto a las demás especies (Tabla 46). El alto nivel de divergencia intraespecífica estuvo relacionado con la distribución geográfica en algunas especies. Los valores de distancia fueron muy similares a los encontrados en COI en las especies relacionadas filogenéticamente, estas mostraron distancias entre 0–6 %, como es el caso de *P. chadlii* con *P. ariasi* y *P. longicuspis* con *P. perniciosus* (Tabla 49).

Con el objetivo de señalar el alcance de los marcadores moleculares *COI* y *CYTB* como herramientas de identificación y análisis genético de especies de flebótomos de interés en la cuenca mediterránea, se realiza una comparación de las variables más importantes, que se presenta en la Tabla 49 y Tabla 50.

Tabla 49. Distancias genéticas en las secuencias del *cytb*. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el modelo K2P. El análisis involucró 175 secuencias de nucleótidos. Nótese los valores de divergencia más altos y más bajos indicados en negrita cotejados con las demás especies.

Distancias genéticas Interespecíficas CYTB																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 <i>P. perniciosus</i>																	
2 <i>P. longicuspis</i>	0,063																
3 <i>P. ariasi</i>	0,184	0,173															
4 <i>P. papatasi</i>	0,250	0,243	0,282														
5 <i>P. sergenti</i>	0,471	0,451	0,507	0,360													
6 <i>P. perfiliewi</i>	0,126	0,120	0,183	0,299	0,420												
7 <i>P. alexandri</i>	0,233	0,227	0,289	0,251	0,353	0,214											
8 <i>P. chadlii</i>	0,173	0,167	0,053	0,254	0,463	0,178	0,261										
9 <i>P. riouxi</i>	0,282	0,274	0,281	0,278	0,388	0,233	0,223	0,260									
10 <i>P. bergeroti</i>	0,215	0,208	0,261	0,053	0,364	0,275	0,216	0,233	0,274								
11 <i>P. chabaudi</i>	0,267	0,260	0,282	0,317	0,343	0,227	0,254	0,290	0,140	0,293							
12 <i>P. neglectus</i>	0,186	0,180	0,234	0,278	0,478	0,204	0,280	0,203	0,303	0,255	0,310						
13 <i>P. tobbi</i>	0,082	0,078	0,191	0,230	0,393	0,126	0,241	0,179	0,268	0,221	0,278	0,180					
14 <i>P. balcanicus</i>	0,238	0,231	0,270	0,239	0,453	0,243	0,237	0,243	0,285	0,243	0,268	0,241	0,212				
15 <i>P. mascittii</i>	0,224	0,217	0,262	0,261	0,455	0,256	0,289	0,243	0,348	0,234	0,330	0,289	0,217	0,226			
16 <i>P. langeroni</i>	0,101	0,096	0,188	0,221	0,402	0,151	0,289	0,181	0,290	0,190	0,292	0,170	0,105	0,237	0,237		
17 <i>S. minuta</i>	0,344	0,326	0,408	0,339	0,411	0,361	0,330	0,396	0,271	0,347	0,308	0,311	0,332	0,305	0,319	0,307	
18 <i>S. fallax</i>	0,172	0,185	0,235	0,310	0,422	0,246	0,281	0,222	0,249	0,266	0,256	0,256	0,172	0,248	0,255	0,198	0,273

Tabla 50. Comparativa de algunas de las variables determinadas en los genes *coi* (288 secuencias) y *cytb* (491 secuencias) en las 20 especies de flebótomos analizados.

COI					Especies	CYTB				
No. Secuencias	No. Países	H	Mín.	Max.		No. secuencias	No. países	H	Mín.	Max.
169	6 + 1X ^a	38	0,000	0,021	<i>P. perniciosus</i>	152	5 + 1X	15	0,004	0,024
17	2	7	0,000	0,025	<i>P. longicuspis</i>	4	3 + 1X	2		0,054
15	2	5	0,002	0,082	<i>P. ariasi</i>	157	6	64	0,000	0,063
11	2 + 1X	10	0,002	0,015	<i>P. papatasi</i>	32	11	13	0,004	0,024
4	2 + 1X	3	0,013	0,074	<i>P. sergenti</i>	15	3	10	0,004	0,444
5	1	3	0,000	0,006	<i>P. perfiliewi</i>	21	5	10	0,004	0,071
14	1	12	0,002	0,011	<i>P. alexandri</i>	14	1	6	0,004	0,012
2	1	2		0,003	<i>P. chadlii</i>	2	1	2		0,004
3	1	2		0,003	<i>P. riouxi</i>	13	2	10	0,004	0,059
1	1	1	n.a	n.a	<i>P. bergeroti</i>	2	2	2		0,008
4	2	2		0,002	<i>P. chabaudi</i>	27	2	11	0,004	0,122
0	0	-	-	-	<i>P. neglectus</i>	12	3	6	0,004	0,040
0	0	-	-	-	<i>P. tobbi</i>	4	1	3	0,004	0,012
0	0	-	-	-	<i>P. balcanicus</i>	2	1	2		0,032
0	0	-	-	-	<i>P. mascittii</i>	1	1	1	n.a	n.a
0	0	-	-	-	<i>P. langeroni</i>	2	2	2		0,004
25	3	23	0,000	0,043	<i>S. minuta</i>	21	2	12	0,004	0,054
4	1	3	0,002	0,017	<i>S. antennata</i>	0	0	-	-	-
10	2	6	0,002	0,011	<i>S. fallax</i>	10	1	4	0,004	0,008
4	1	2		0,023	<i>S. clydei</i>	0	0	-	-	-

H: Número de haplotipos

Mín-Max: Valores de las divergencias intraespecíficas.

^a Los números en rojo junto con la X (1X) indican la ausencia de información respecto al origen geográfico de la secuencia.

Las especies resaltadas en rosa son aquellas en las que no pudo coincidir el análisis para ambos marcadores, dado que no existían secuencias disponibles en el Genbank.

3.4.3. Análisis filogenéticos

Las relaciones filogenéticas entre las distintas especies de flebótomos estudiadas se analizaron utilizando como base los alineamientos de la secuencia de 119 haplotipos para el gen *coi* y 175 haplotipos para el *cytb*. Para ambos genes, la topología de los árboles obtenidos fue similar independientemente del modelo utilizado. Sin embargo, los tiempos de ejecución variaron de 10 minutos a 8 horas (Tabla 51). Tanto el análisis de NJ como el de ML demostraron ser útiles para identificar las distintas especies, así como para mostrar divergencias intraespecíficas. Los haplotipos que presentaron menor distancia genética entre sí se agruparon en el mismo clado.

Tabla 51. Comparativa de los tiempos de ejecución de los programas empleados en el análisis de código de barras de ADN.

Tiempo	Procedimiento	Programa
c10 minutos	Neighbor-Joining (K2P) 2.000 réplicas de <i>bootstrap</i>	MEGA6
c10 minutos	Neighbor-Joining (<i>p-distance</i>) 2.000 réplicas de <i>bootstrap</i>	
c8 horas	Máxima Verosimilitud (GTR+G+I) 2000 réplicas de <i>bootstrap</i>	
c15 minutos	Máxima Verosimilitud (GTR+G+I) aBayes*	PhyML3.0

En este trabajo seleccionamos el modelo ML (GTR+G+I) y NJ (K2P) para ilustrar de manera gráfica los resultados (Figura 54 y Figura 55). Del análisis en conjunto se puede inferir que los dos géneros y subgéneros se separaron claramente en el árbol, mostrando una concordancia absoluta entre la clasificación morfológica y la realizada mediante métodos moleculares. Todos los especímenes españoles pudieron ser confirmados por el análisis filogenético y las secuencias obtenidas en este trabajo se agruparon correctamente con los demás representantes de su especie, apoyados por valores de *bootstrap* >90%.

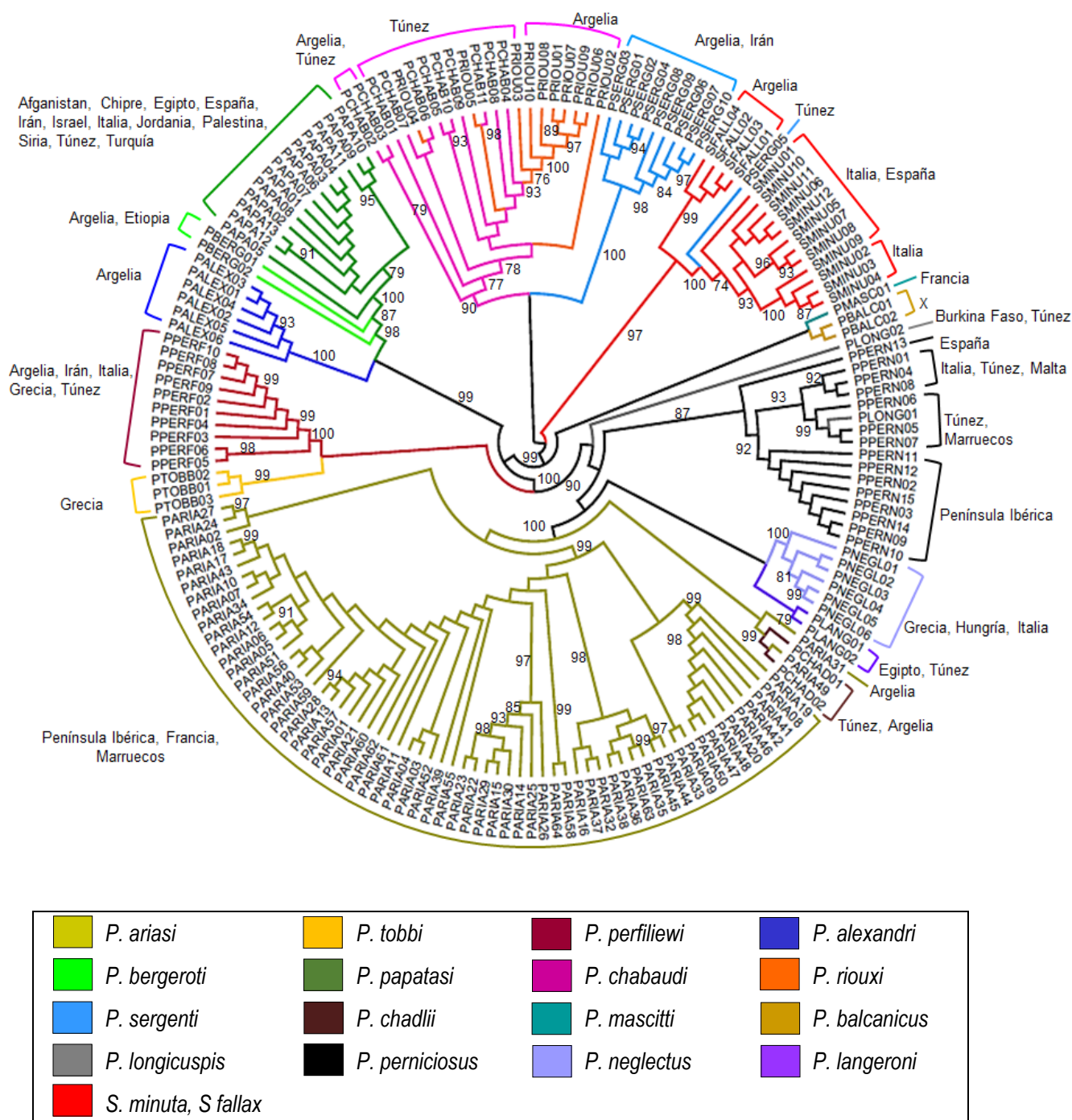
A pesar de que el análisis filogenético basado en secuencias COI no mostró una agrupación de los especímenes del subgénero *Larrousius* tan evidente como cuando se utiliza el gen *cytb*, los especímenes de la misma especie se agruparon entre sí, independientemente de su origen geográfico. En el árbol filogenético obtenido con las secuencias *coi* se pueden distinguir 7 grupos principales, apoyados por elevados valores de *bootstrap*, se obtiene un resultado similar independientemente del gen y el modelo de evolución empleado (Figura 54). Llama la atención que *P. alexandri*, clasificado dentro del subgénero *Paraphlebotomus* en función de sus caracteres morfológicos, se agrupa con especies del subgénero *Phlebotomus* (específicamente con *P.*

papatasi y *P. bergeroti*) tanto en el análisis del gen *coi* como en el del *cytb* (Figura 54 y Figura 55). También llama la atención que ninguno de los análisis separa a *P. ariasi* de *P. chadlii*, por lo que se ubican en parafilia. Del mismo modo, las especies de *P. chabaudi* y *P. riouxi* se encuentran cercanamente relacionados dentro de un mismo clado.

En algunos grupos de especies el análisis de los árboles generados con las secuencias de *coi* se evidenció segregación geográfica. Principalmente en dos especies, *P. perniciosus* y *S. minuta*. Cada una de estas especies proviene de un grupo monofilético como ya se ha explicado, pero los individuos que lo componen se dividieron en subgrupos de acuerdo al origen geográfico (Figura 54). Un grupo de *P. perniciosus* incluye 19 haplotipos todos ellos encontrados en la Península Ibérica e Islas Baleares, agrupados con un valor de *bootstrap* del 81%. Un segundo subgrupo agrupa con 97 % de probabilidad a 14 haplotipos que incluye ejemplares de Argelia, Italia, Malta, centro y norte de Túnez. Mientras que el tercer subgrupo de *P. perniciosus* soportado con 99% de confiabilidad, contiene 5 haplotipos, todos ellos procedentes del sur de Túnez. Algo similar se observa en *S. minuta*, donde se observa un grupo compuesto por especímenes españoles agrupados con 77% de confiabilidad y otro compuesto por ejemplares de Argelia y Túnez con un soporte del 100% (Figura 54).



Figura 56. Árbol consenso obtenido del análisis de secuencias del fragmento del **gen *cytb*** de 18 especies de flebotomos diferentes (175 haplotipos), según el método de **Máxima Verosimilitud (aBayes), modelo GTR+I+G** y 2000 réplicas de *bootstrap*. Los valores mostrados representan el porcentaje de soporte de cada uno de los grupos. Los colores indican los grupos o especies incluidos en el análisis. El país/región de origen para cada grupo de individuos está indicado fuera del árbol.



4. DISCUSIÓN

La identificación correcta de las especies de vectores es de gran importancia en la vigilancia y el control de las enfermedades que transmiten. Los datos obtenidos muestran por primera vez que es posible aplicar el código de barras de ADN en la identificación de especies de flebótomos en España. Para las que no existían reportadas en las bases de datos secuencias de ADN que incluyera ambos marcadores *coi* y *cytb*, en un mismo ejemplar. Un total de 155 flebótomos capturados en 11 localidades españolas han podido ser identificados utilizando esta aproximación. Las secuencias *cytb* obtenidas fueron depositadas en la base de datos del Genbank bajo los números de acceso KP685413-KP702264, mientras que las secuencias obtenidas del gen *coi* están en preparación para este fin.

Los resultados indican que la variación nucleotídica que exhiben las secuencias tanto del fragmento de *coi* como *cytb* usados como códigos de barras de ADN, permiten identificar especies e incluso haplotipos. Con este trabajo pretendemos consolidar una metodología de identificación molecular sencilla y que pueda ser de utilidad incluso con ejemplares incompletos, deteriorados y/o de difícil identificación debido a las similitudes morfológicas que presentan algunas especies de flebótomos. De igual manera resaltamos el valor agregado de la metodología empleada, que ha permitido conservar las características morfológicas indispensables para la taxonomía clásica (cibarium y genitalia), permitiendo el mantenimiento de una colección de ejemplares, como es conveniente en todos los estudios entomológicos (Figura 58).

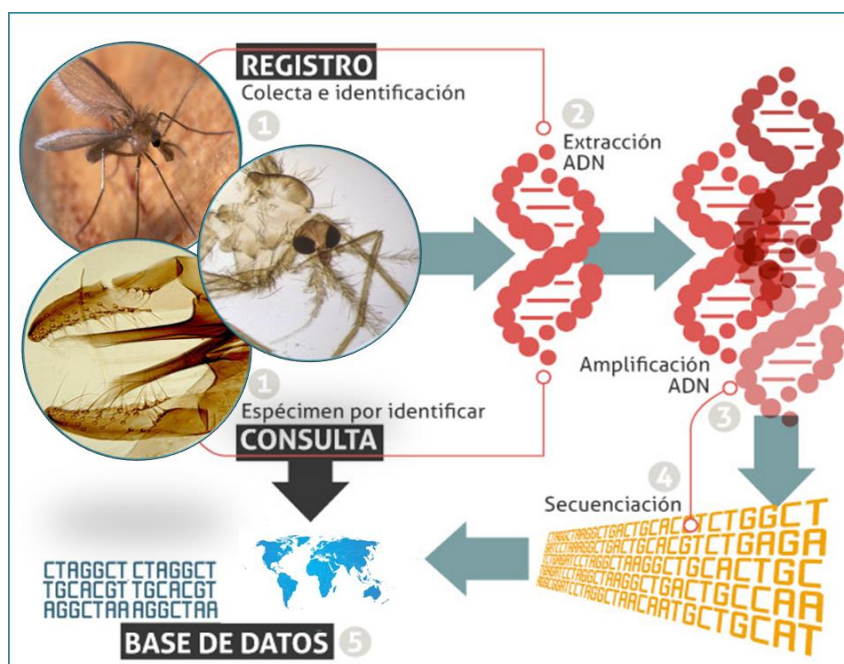


Figura 58. Estrategia experimental para la generación de códigos de barras de ADN y la identificación molecular de flebótomos.

Cabe destacar que en este estudio se han encontrado especies de flebótomos en localizaciones en que no habían sido descritos hasta la fecha, como *P. ariasi* en Burgos, *P. papatasi* en Huelva y *P. perniciosus* en Segovia. Confirmando la carencia de muestreos sistemáticos de flebótomos en la Península Ibérica y Baleares.

En términos generales, el uso de la metodología de 'códigos de ADN' basada en la amplificación de los genes mitocondriales *coi* y *cyt b*, reveló una clara capacidad para discriminar entre especies, observándose una gran reciprocidad entre los resultados obtenidos con los dos genes. Además nuestros resultados están en concordancia con trabajos de sistemática molecular realizados por otros autores, utilizando tanto el *cytb* y como otros marcadores moleculares (Bounamous *et al.*, 2014; Di Muccio *et al.*, 2000; Esseghir *et al.*, 2000). La agrupación de las especies según sus secuencias *coi* y *cytb*, fue correcta con excepción de una secuencia del *cytb* de *P. sergenti*, procedente de Túnez, la cual se agrupó dentro del subgénero *Sergentomyia*. Dicha incongruencia sugiere una incorrecta identificación del espécimen por parte de los autores que depositaron la secuencia en la base de datos y debe prestarse atención a esta cuestión dado que la información de las bases de datos públicas representa un importante recurso para otros investigadores y debería tener un buen control de calidad.

Hemos observado que el polimorfismo genético de las especies simpátricas *P. perniciosus* y *P. longicuspis* es suficiente para separarles, a pesar de su similitud morfológica y el debate sobre su clasificación en función de criterios morfológicos (Martín-Sánchez *et al.*, 2000). Otras dos especies similares desde el punto de vista morfológico son *P. riouxi* y *P. chabaudi*. Ambas se encuentran en áreas solapadas en regiones de Túnez y Argelia. Según nuestros datos, no existen diferencias significativas a nivel nucleotídico que permitan concluir que *P. riouxi* y *P. chabaudi* sean especies independientes, al contrario de lo que proponen Bounamous *et al.*, (2014). Nuestros resultados sí estarían en concordancia con datos filogenéticos obtenidos por Tabbabi *et al.*, (2014) basados en la secuencia del *cytb* y el *factor de elongación 1- α* .

También observamos que nuestros análisis, excluyen a *P. alexandri* del subgénero *Paraphlebotomus*, apoyando estudios de otros autores que sugieren una clasificación parafilética para este grupo (Bounamous *et al.*, 2014; Depaquit *et al.*, 2000; Krüger *et al.*, 2011).

Un aspecto importante en la validación de la herramienta de códigos de barra de ADN, es la estimación de la distancia genética intra- e inter-especies, en donde el valor inferior de las distancia interespecífica debe ser mayor que el valor superior de las distancias intraespecíficas, para evitar un solapamiento entre estos parámetros (Meyer & Paulay, 2005). Nuestros resultados muestran que la distancia intraespecífica en *coi* fluctuó entre 0,0%–8,2%, con un promedio fue

de 2.4% y la interespecífica entre 18%-23% (promedio de 20%). En el caso de las secuencias *cytb*, las distancias fueron mayores: distancia intraespecífica promedio 6% (0,4%–44%) e interespecífica promedio 26% (21% – 41%).

P. sergenti has sido la especie más heterogénea en nuestro estudio, para la que ya se habían descrito múltiples linajes mitocondriales (*coi* y *cytb*) para especímenes procedentes de diferentes áreas geográficas (Argelia, Irán, Israel y Túnez). Sin embargo, ninguno de los estudios revisados destaca un vínculo entre la variabilidad molecular intraespecífica y cambios morfológicos (Barón *et al.*, 2008; Depaquit *et al.*, 2002; Dvorak *et al.*, 2011; Moin-vaziri *et al.*, 2007). Nuestros resultados ponen de manifiesto la existencia de dos poblaciones o linajes, independientemente del marcador utilizado. Dichas poblaciones están claramente separadas y se caracterizan por presentar varios sitios polimórficos: 44 en la secuencia *coi* y 80 en *cytb*, además de una distancia genética intraespecíficas que varió del 7% en COI a 44% en CYTB. Estos datos podrían apuntar a la existencia de especies crípticas (o especies hermanas) en *P. sergenti*, como ya han planteado otros autores (Barón *et al.*, 2008) *P. sergenti*, es el principal vector de *L. tropica*, y está ampliamente representado en España, mientras que *L. tropica* no es una especie endémica en este país. Sin embargo, el flujo migratorio humano desde regiones donde *L. tropica* es endémica, la existencia del vector en nuestro medio y el hecho de que *L. tropica* podría transmitirse en un ciclo antroponótico, sin necesidad de un reservorio animal específico, podrían conducir al establecimiento y propagación de *L. tropica* en nuestro entorno, tal y como ha ocurrido en el norte de Marruecos (Rhajaoui *et al.*, 2004). La capacidad vectorial de *P. sergenti* podría depender de la existencia de especies crípticas, que sólo pueden identificarse por métodos moleculares. En este sentido, nuestros resultados demuestran la utilidad de los códigos de barras de ADN en la identificación y el estudio de las diferentes poblaciones de *P. sergenti*.

La distribución geográfica de los flebotomos cada vez es más amplia y puede que esté relacionada con mecanismos de adaptación que dejen una huella en su genoma. El análisis mediante código de barras de ADN reveló distintas poblaciones en cada una de las especies analizadas, que podrían reflejar el flujo genético y los procesos de deriva genética que dan lugar a distintos linajes divergentes (Boudabous *et al.*, 2009). Además de los mecanismos intrínsecos de adaptación, existen también factores ambientales que pudieran propiciar la propagación de los vectores, como el cambio climático y el uso intensivo de insecticidas, etc. Por ello, es una prioridad acelerar la descripción de las diferentes especies y linajes de flebotomos, mediante el uso de abordajes moleculares que soporten los análisis morfológicos de manera rápida, sencilla y económica. En la actualidad, el uso de estas herramientas es aun limitado, pero se prevé que en el futuro esta situación cambiará, y las herramientas moleculares se integrarán plenamente en los estudios de

identificación de especies de vectores, contribuyendo a una mejor comprensión de la epidemiología de las enfermedades que transmiten.

Durante el tiempo en que hemos desarrollado este trabajo, otros investigadores en diferentes partes del Mundo han utilizado la misma metodología, o similar, para identificar especies de flebótomos e identificar complejos crípticos en distintos géneros de flebótomos (*Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, y *Warileya*) del Nuevo y el Viejo Mundo (N. P. Kumar *et al.*, 2012; Maia *et al.*, 2015; Nzelu *et al.*, 2015; Pinto Ide *et al.*, 2015; Polsela *et al.*, 2015; Romero-Ricardo *et al.*, 2016).

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Este es probablemente el mayor estudio de epidemiología molecular de *Leishmania infantum* que se ha desarrollado hasta la fecha. El elevado tamaño de muestra empleado ha permitido identificar genotipos de *L. infantum* que habían pasado inadvertidos en otros estudios, utilizando el mismo tipo de marcadores moleculares.
2. Hemos demostrado que el estudio de las secuencias de los marcadores moleculares ITS y K26 son herramientas ventajosas en estudios epidemiológicos, los cuales permiten identificar la variabilidad genética del parásito y ayudan a entender la dinámica de transmisión de *L. infantum* en zonas donde los ciclos silvestres y domésticos del parásito pueden superponerse por proximidad.
3. El análisis de K26 mostró un alto grado de polimorfismo entre aislados de diversas regiones de España. Las nueve STs descritas representan una variación genética importante dentro de *L. infantum*, que podría reflejar la plasticidad de estos parásitos. En este sentido, nuestro análisis confirma que las deleciones y duplicaciones de segmentos genéticos constituyen una fuente importante de variabilidad dentro de *L. infantum*.
4. El análisis de secuencias multilocus permitió establecer 4 poblaciones principales de *L. infantum* en África y Eurasia, obteniéndose genotipos específicos a nivel regional. Esta metodología mostró un elevado poder de resolución, identificando 175 genotipos diferentes en una muestra de 385 cepas de *L. infantum*.
5. Dos poblaciones parecen estar implicadas en los casos del reciente brote de leishmaniasis de la Comunidad de Madrid, la primera ampliamente distribuida en la cuenca mediterránea, y que podría ser ancestral, y una segunda población que estaría relacionada con un ciclo de transmisión más específico o haber emergido más recientemente.
6. Utilizando una muestra más amplia que estudios anteriores, se confirma que el sistema MLEE no es el método más apropiado para estudiar la variabilidad genética de *L. infantum*, al comprobarse que distintos genotipos son clasificados un mismo zimodema. Al menos en el zimodema MON-1, el más frecuente en nuestro entorno, hemos descrito 3 tipos de ITS, 7 formas diferentes de K26 y 54 genotipos LST que se engloban en dos grandes poblaciones (A y B).

7. En contra de lo indicado por Latrofa *et al.* (2012), el método de PCR-RFLP que tiene como diana los genes *cytb* y *nd1* de los flebótomos no resultó de utilidad para discriminar de manera fiable las especies de flebótomos que son endémicas en la región mediterránea.
8. La metodología de *DNA barcoding* sí resultó de gran utilidad en la identificación de especies de flebótomos de la región mediterránea, mostrando una correlación del 100% con la taxonomía morfológica. Y siendo además útil para resolver especies difíciles de distinguir morfológicamente (como *Phlebotomus perniciosus* y *P. longicuspis*).
9. El análisis filogenético de las secuencias de los genes *coi* y *cytb* permitió, en alguna de las especies estudiadas, identificar subpoblaciones en función del área de distribución geográfica.
10. El trabajo presentado en esta tesis doctoral ha permitido evaluar una serie de herramientas para el tipado molecular de *L. infantum* y especies de flebótomos de la región mediterránea. Herramientas que, combinadas, pueden contribuir a un sistema de vigilancia de la leishmaniasis en Europa y la cuenca mediterránea, permitiendo seguir la evolución y propagación de las distintas poblaciones de *L. infantum* y los vectores de esta y otras especies de *Leishmania*.

V. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aagaard-Hansen, J., Nombela, N., Alvar, J. (2010). Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases., *Trop. Med. Int. Health*. England, **15**(11): 1281–1288.
- Abbasi, I., Warburg, A. (2012). *Phlebotomus* sandfly species identification based on cytochrome oxidase DNA sequence. Department of Molecular Genetics and Microbiology, *Hebr. Univ. Jerusalem, Isr.*
- Abbonenc, E. (1972). Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae), *En Mémoires ORSTOM*, (55): 1–289.
- Abellán-García, C., Sánchez-Serrano, L. P., Cañavate, M. C., Nieto, F. J. (2005). Leishmaniasis in Spain. Comunicación presentada en el III Congreso Mundial sobre Leishmaniasis, Palermo-Terrasini, Italia.
- Abranches, P., Conceicao Silva, F. M., Ribeiro, M. M., Lopes, F. J., Gomes, L. T. (1983). Kala-azar in Portugal--IV. The wild reservoir: the isolation of a *Leishmania* from a fox., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* England, 420–421.
- Acedo-Sánchez, C., Morillas-Márquez, F., Sanchiz-Marín, M. C., Martín-Sánchez, J. (1998). Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain., *Vet. Parasitol.* Netherlands, **75**(1): 1–8.
- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.-X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M. G., Hale, J. L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L. H., Brisse, S. (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*., *PLoS Pathog.* United States, **8**(6): e1002776.
- Afonso, M. O., Campino, L., Cortes, S., Alves-Pires, C. (2005). The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII--Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrabida leishmaniasis focus., *Parasite.* France, **12**(1): 69–72.
- Aguado, M., Espinosa, P., Romero-Mate, A., Tardio, J. C., Córdoba, S., Borbujo, J. (2013). Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Fuenlabrada, Madrid., *Actas Dermosifiliogr.* Spain, **104**(4): 334–342.
- Alcaide, M., Rico, C., Ruiz, S., Soriguer, R., Munoz, J., Figuerola, J. (2009). Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals., *PLoS One.* United States, **4**(9): e7092.
- Alcover, M. M. (2014). Los flebotomos de las islas de Mallorca y Menorca y su papel focalizador en la distribución de las leishmaniosis Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries. Universitat de Barcelona.
- Alcover, M. M., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ballart, C., Castillejo, S., Picado, A., Portus, M., Gallego, M. (2012). Application of molecular techniques in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis., *Parasitol. Res.* Germany, **111**(2): 515–523.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool., *J. Mol. Biol.*, **215**(3): 403–10.
- Alvar, J. (2001). La leishmaniasis: de la biología al control. Salamanca: Laboratorio Intervet, S.A.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., López-Vélez, R., Moreno, J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years, *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**(2): 334–359.
- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R., Moreno, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R., Moreno, J. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years., *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**(0893–8512 (Print)): 298–319.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). Canine Leishmaniasis, 1–88. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X0457001X>.
- Alvar, J., Jiménez, M. (1994). Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs?,

- AIDS. England, 854.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS One*, **7**(5): e35671.
- Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty., *Trends Parasitol.* England, **22**(12): 552–557.
- Amela, C., Suárez, B., Isidoro, B., Sierra, M. J., Santos, S., Simón, F. (2012). Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES), Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Madrid.
- Amusategui, I., Sainz, A., Aguirre, E., Tesouro, M. A. (2004). Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1026**: 154–157.
- Anders, R. F. (1986). Multiple cross-reactivities amongst antigens of *Plasmodium falciparum* impair the development of protective immunity against malaria., *Parasite Immunol.* England, **8**(6): 529–539.
- Antinori, S., Cascio, A., Parravicini, C., Bianchi, R., Corbellino, M. (2008). Leishmaniasis among organ transplant recipients., *Lancet. Infect. Dis.* United States, **8**(3): 191–199.
- Antinori, S., Schifanella, L., Corbellino, M. (2012). Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Germany, **31**(2): 109–118.
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., Volf, P. (2013). The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region., *Euro Surveill.*, **18**(30): 20540.
- Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pratlong, F., Dedet, J.-P., Soteriadou, K. (2009). *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus., *Lancet. Infect. Dis.* United States, 76–77.
- Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pratlong, F., Dedet, J., Soteriadou, K. (2008). Reaction and Reaction, *Lancet Infect. Dis.*, **37**(January): 7–9.
- Aránguez-Ruiz, E., Arce-Arnáez, A., Moratilla-Monzo, L., Estirado-Gómez, A., Iriso-Calle, A., De la Fuente-Ureña, Santiago José-Soto, M., Fúster-Lorán, F., Ordobás-Gavín, M., Martínez-Serrano, A., Vilas-Herranz, F. (2014). Análisis espacial de un brote de leishmaniasis en el sur del Área metropolitana de la Comunidad de Madrid . 2009-2013, *Rev. salud Ambient.*, **14**(1): 39–53.
- Aransay, A., Ready, P., Morillas-Marquez, F. (2003). Population differentiation of *Phlebotomus perniciosus* in Spain following postglacial dispersal, *Hered.*, (90(4):316-25).
- Aransay, A., Scoulica, E., Tselentis, Y. (2000). Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA., *Appl. Environ. Microbiol.* United States, **66**(5): 1933–1938.
- Aransay, A., Testa, J. M., Morillas-Marquez, F., Lucientes, J., Ready, P. D. (2004). Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain., *Parasitol. Res.* Germany, **94**(6): 416–420.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., De La Fuente, S., Martínez2, A. M., Pérez, A. M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, *Euro Surveill*, **18**(30).
- Artemiev, M. (1978). Sandflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) of Afghanistan Kabul: Ministry of Public Health.
- Ashford, R. W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control., *Clin. Dermatol.* United States, **14**(5): 523–532.
- Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses, *Int. J. Parasitol.*, **30**(12–13): 1269–1281.
- Avise, J. C. (1994). Molecular Markers, Natural History and Evolution., *J. Evol. Biol.* Blackwell Science Ltd.

- Ayllon, T., Diniz, P. P. V. P., Breitschwerdt, E. B., Villaescusa, A., Rodriguez-Franco, F., Sainz, A. (2012). Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain., *Vector Borne Zoonotic Dis.* United States, **12**(2): 143–150.
- B.O.E. (1982). Resolución de 22 de diciembre de 1981, de la Dirección de Salud Pública, por la que se modifica la lista de enfermedades de declaración obligatoria, Anexo I. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- B.O.E. (2015). Resolución de Orden SSI/445/2015 por la que se modifican los anexos I, II y III del R.D. 2210/1995, de 28 de diciembre, relativos a la lista de E.D.O.
- Baldelli, R., Piva, S., Salvatore, D., Parigi, M., Melloni, O., Tamba, M., Bellini, R., Poglayen, G. (2011). Canine leishmaniasis surveillance in a northern Italy kennel., *Vet. Parasitol.* Netherlands, **179**(1–3): 57–61.
- Baleela, R., Llewellyn, M. S., Fitzpatrick, S., Kuhls, K., Schonian, G., Miles, M. A., Mauricio, I. L. (2014). *Leishmania donovani* populations in Eastern Sudan: temporal structuring and a link between human and canine transmission., *Parasit. Vectors.* England, **7**: 496.
- Ballart, C., Baron, S., Alcover, M. M., Portus, M., Gallego, M. (2012). Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: first finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*., *Acta Trop.* Netherlands, **122**(1): 155–159.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one., *Trends Parasitol.* England, **24**(7): 324–330.
- Bañuls, A.-L., Hide, M., Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans., *Adv. Parasitol.* England, **64**: 1–109.
- Barón, S., Martín-sánchez, J., Gállego, M., Morales-yuste, M., Boussaa, S., Morillas-Márquez, F. (2008). Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco, *Acta Trop.*, **107**: 259–267.
- Barral, A., Costa, J. M., Bittencourt, A. L., Barral-Netto, M., Carvalho, E. M. (1995). Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects., *Int. J. Dermatol.* England, **34**(7): 474–479.
- Bastien, P., Blaineau, C., Pages, M. (1992). *Leishmania*: sex, lies and karyotype., *Parasitol. Today.* England, **8**(5): 174–177.
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies, *Int. J. Parasitol.*, **37**(10): 1097–1106.
- BECEM (2012). Brote comunitario de Leishmaniasis en la zona suroeste de la comunidad de Madrid, 2009-2012, 2–8. Disponible en:
<http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=ContentDisposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3DBrote+Leishmaniasis+200912.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1310973741904&ssbinary=true>.
- BECEM (2015). Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid. Disponible en:
http://www.madrid.org/cs/Satellite?cid=1265618561630&language=es&pagename=PortalSalud%2FPage%2FPSTA_servicioPrincipal&vest=1156329914017#.
- Bern, C., Maguire, J. H., Alvar, J. (2008). Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis., *PLoS Negl. Trop. Dis.* United States, **2**(10): e313.
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., Dunan, S. (1996). Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* United States, **55**(3): 273–277.
- Bettini, S., Gradoni, L., Pozio, E. (1978). Isolation of *Leishmania* strains from *Rattus rattus* in Italy., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* England, 441–442.

- Bettini, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., Atzeni, M. C. (1986). Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, in the province of Cagliari., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. England*, **80**(3): 458–459.
- Bhattacharyya, T., Boelaert, M., Miles, M. A. (2013). Comparison of visceral leishmaniasis diagnostic antigens in African and Asian *Leishmania donovani* reveals extensive diversity and region-specific polymorphisms., *PLoS Negl. Trop. Dis.* Public Library of Science, **7**(2): e2057. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002057> [20 January 2017].
- Biglino, A., Bolla, C., Concialdi, E., Trisciuglio, A., Romano, A., Ferroglio, E. (2010). Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of Northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic, *J. Clin. Microbiol.*, **48**(1): 131–136.
- Bogdan, C., Schonian, G., Banuls, A. L., Hide, M., Pratlong, F., Lorenz, E., Rollinghoff, M., Mertens, R. (2001). Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature., *Clin. Infect. Dis.* United States, **32**(2): 302–306.
- Boite, M. C., Mauricio, I. L., Miles, M. A., Cupolillo, E. (2012). New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania* (*Viannia*) parasites based on multilocus sequence analysis., *PLoS Negl. Trop. Dis.* United States, **6**(11): e1888.
- Botet-Fregola, J., Portús-Vinyeta, M. (1993). La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión historico-bibliográfica (1912-1985), *Rev San Hig Púb*, (4): 255–266.
- Boudabous, R., Bounamous, A., Jouet, D., Depaquit, J., Augot, D., Ferte, H., Berchi, S., Couloux, A., Veuille, M., Barba, H. (2009). Mitochondrial DNA Differentiation Between Two Closely Related Species, *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *chabaudi* and *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *riouxi* (Diptera: Psychodidae), Based on Direct Sequencing and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Le, *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **102**(3): 347–353.
- Boudabous, R., Jaouadi, K., Bounamous, A., Babba, H. (2012). Morphological and Molecular Investigations of Population Structure of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in Tunisia, *J. Med. Entomol.*, **49**(4): 787–793.
- Bounamous, A., Boudabous, R., Jouet, D., Augot, D., Ferte, H., Babba, H., Berchi, S., Depaquit, J. (2008). Molecular and morphological characterisation of two closely related species belonging to the subgenus *Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnenc & Rioux, 1970 et *P. riouxi* Depaquit, Killick-Kendrick & Leger, 1998 (Diptera: Psychodidae), *Parasite*. France, **15**(4): 565–571.
- Bounamous, A., Lehrter, V., Hadj-henni, L., Delecolle, J., Depaquit, J. (2014). Limits of a rapid identification of common Mediterranean sandflies using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, (March): 1–7.
- Bras-Gonçalves, R., Petitdidier, E., Pagniez, J., Veyrier, R., Cibrelus, P., Cavaleira, M., Maquaire, S., Moreaux, J., Lemesre, J.-L. (2014). Identification and characterization of new *Leishmania* promastigote surface antigens, LaPSA-38S and LiPSA-50S, as major immunodominant excreted/secreted components of *L. amazonensis* and *L. infantum*., *Infect. Genet. Evol.* Netherlands, **24**: 1–14.
- Brooker, S., Utzinger, J. (2007). Integrated disease mapping in a polyparasitic world., *Geospat. Health*. Italy, **1**(2): 141–146.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J. A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J. M., Afonso, M. O., Dedet, J. P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: Enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains, *Trop. Med. Int. Heal.*, **11**(11): 1708–1714.
- Cardoso, L., Lopes, A. P., Sherry, K., Schallig, H., Solano-Gallego, L. (2010). Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA., *Vet. Parasitol.* Netherlands, **174**(1–2): 37–42.
- Carrillo, E., Moreno, J., Cruz, I. (2013). What is responsible for a large and unusual outbreak of leishmaniasis in Madrid?, *Trends Parasitol.* Elsevier Ltd, **29**(12): 579–580.
- Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A., De Mattia, F. (2010). DNA barcoding: a six-question

- tour to improve users' awareness about the method., *Brief. Bioinform.* England, **11**(4): 440–453.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life., *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* England, **73**(3): 203–266.
- Charrel, R. N., Bichaud, L., de Lamballerie, X. (2012). Emergence of Toscana virus in the mediterranean area., *World J. Virol.* United States, **1**(5): 135–141.
- Chicharro, C., Jiménez, M. I., Alvar, J. (2003). Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain., *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **97** Suppl 1(1): 57–64.
- Chicharro, C., Llanes-Acevedo, I. P., García, E., Nieto, J., Moreno, J., Cruz, I. (2013). Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012., *Euro Surveill.*, **18**(30): 20545.
- Chitimia, L., Muñoz-García, C. I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., del Río, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Giménez-Font, P., Jiménez-Montalbán, P., Martínez-Ramírez, Á., Meseguer-Meseguer, J. M., García-Bacete, I., Sánchez-Isarria, M. A., Sanchis-Monsonís, G., García-Martínez, J. D., Vicente, V., Segovia, M., Berriatua, E. (2011). Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain, *Vet. Parasitol.*, **181**(1): 12–16.
- Colwell, D. D., Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2011). Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives., *Vet. Parasitol.* Netherlands, **182**(1): 14–21.
- Conesa-Gallego, E., Romera-Lozano, E., Martínez-Ortega, E. (1997). Estudio De Las Poblaciones De Flebotomos (Diptera, Psychodidae) De La Comunidad De Madrid (España), *An. Biol.*, **0**(22): 43–50.
- Criado-Fornelio, A., Gutierrez-Garcia, L., Rodriguez-Caabeiro, F., Reus-Garcia, E., Roldan-Soriano, M. A., Diaz-Sanchez, M. A. (2000). A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain., *Vet. Parasitol.* Netherlands, **92**(4): 245–251.
- Cruz, I., Millet, A., Carrillo, E., Chenik, M., Salotra, P., Verma, S., Veland, N., Jara, M., Adaui, V., Castrillon, C., Arevalo, J., Moreno, J., Canavate, C. (2013). An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis., *Exp. Parasitol.* United States, **134**(3): 281–289.
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Cañavate, C., Desjeux, P., Alvar, J. (2006). *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade., *Indian J. Med. Res.* India, **123**(3): 357–388.
- Cunha, J., Carrillo, E., Sánchez, C., Cruz, I., Moreno, J., Cordeiro-da-silva, A. (2013). Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV + and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis, *Parasit. Vectors*, **6**: 1–14.
- Cupolillo, E., Brahim, L. R., Toaldo, C. B., Oliveira-Neto, M. P., Brito, M. E. F., Falqueto, A., Farias Naiff, M., Grimaldi, G. (2003). Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil., *J. Clin. Microbiol.*, **41**(7): 3126–32.
- Cupolillo, E., Grimaldi, G. J., Momen, H. (1994). A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* United States, **50**(3): 296–311.
- de Almeida, M. C. (2002). Infective inoculum for *Leishmania*., *Trends Parasitol.* England, 154–155.
- De la Loma, A., Alvar, J., Martinez Galiano, E., Blazquez, J., Alcala Munoz, A., Najera, R. (1985). Leishmaniasis or AIDS?, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* England, 421–422.
- de Ruiter, C. M., van der Veer, C., Leeftang, M. M. G., Deborggraeve, S., Lucas, C., Adams, E. R. (2014). Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy., *J. Clin. Microbiol.* United States, **52**(9): 3147–3155.
- Dedet, J. P., Pratlong, F. (2003). Manson's Tropical Diseases. En: Leishmaniasis. Sección 10. Capítulo 75.
- Del Rio, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De la Rua, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Munoz-Garcia, C. I., Goyena, E., Garcia-Martinez, D., Fisa, R., Riera, C., Murcia, L., Segovia, M., Berriatua,

- E. (2014). Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in L. infantum periendemic northern Spain., *Prev. Vet. Med. Netherlands*, **113**(4): 430–435.
- Depaquit, J. (2014). Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: review and perspectives., *Infect. Genet. Evol. Netherlands*, **28**: 744–756.
- Depaquit, J., Ferté, H., Léger, N., Killick-Kendrick, R., Rioux, J., Killick-Kendrick, M., HA, H., Gobert, S. (2000). Molecular systematics of the Phlebotomine sandflies of the subgenus *Paraphlebotomus* (Diptera, Psychodidae, *Phlebotomus*) based on ITS2 rDNA sequences. Hypotheses of dispersion and speciation, *Insect Mol Biol*, **9**(3): 293–300.
- Depaquit, J., Ferte, H., Leger, N., Lefranc, F., Alves-Pires, C., Hanafi, H., Maroli, M., Morillas-Marquez, F., Rioux, J.-A., Svobodova, M., Volf, P. (2002). ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*., *Int. J. Parasitol. England*, **32**(9): 1123–1131.
- Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P. E., Peyrefitte, C. (2010). Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe : a review, 1–8.
- Depaquit, J., Muller, F., Gantier, J.-C., Leger, N., Ferte, H., Ready, P., Niang, A. . (2004). Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) from Ouagadougou, Burkina Faso: first record of *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis* Nitzulescu south of the Sahara., *Fac. Pharm. Univ. Reims Champagne-Ardenne, Fr.*
- Depledge, D., Maclean, L., Hodgkinson, M., Smith, B., Jackson, A., Ma, S., Uliana, S. R. B., Smith, D. F. (2010). *Leishmania*-specific surface antigens show sub-genus sequence variation and immune recognition, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **4**(9).
- Dereure, J., Vanwambeke, S. O., Malé, P., Martinez, S., Pratlong, F., Balard, Y., Dedet, J.-P. (2009). The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France., *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **9**(6): 687–694.
- Desjeux, P. (1996). Leishmaniasis. Public health aspects and control., *Clin. Dermatol. United States*, **14**(5): 417–423.
- Desjeux, P. (2001). Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis., *Med. Microbiol. Immunol. Germany*, **190**(1–2): 77–79.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives., *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. England*, **27**(5): 305–318.
- Desjeux, P., Alvar, J. (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe., *Ann. Trop. Med. Parasitol. England*, **97 Suppl 1**: 3–15.
- Di Muccio, T., Marinucci, M., Frusteri, L., Maroli, M., Pesson, B., Gramiccia, M. (2000). Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larroussius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30**: 387–393.
- Doha, S., Shehata, M. G. (1992). *Leishmania infantum* MON-98 isolated from naturally infected *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae) in El Agamy, Egypt., *J. Med. Entomol. England*, **29**(5): 891–893.
- Dowlati, Y. (1996). Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect., *Clin. Dermatol. United States*, **14**(5): 425–431.
- Dufour, B., Moutou, F., Hattenberger, A. M., Rodhain, F. (2008). Global change: impact, management, risk approach and health measures--the case of Europe., *Rev. Sci. Tech. France*, **27**(2): 529–550.
- Dujardin, J., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y., Boelaert, M. (2008). Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe., *Emerg Infect Dis.*, **14**(7): 1013–8.
- Dvorak, V., Votykka, J., Aytekin, A. M., Alten, B., Volf, P. (2011). Intraspecific variability of natural populations of *Phlebotomus sergenti*, the main vector of *Leishmania tropica*., *J. Vector Ecol. United States*, **36 Suppl 1**: S49–57.

- Earl, D. A., vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method, *Conserv. Genet. Resour.*, **4**(2): 359–361. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
- Ejov, M., Dagne, D. (2014). Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014–2020, *World Heal. Organ.*, 1–17.
- El Baidouri, F., Diancourt, L., Berry, V., Chevenet, F., Pratlong, F., Marty, P., Ravel, C. (2013). Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: what does MLSA tell us., *PLoS Negl. Trop. Dis.* United States, **7**(6): e2255.
- El Tai, N. O., El Fari, M., Mauricio, I., Miles, M. a, Oskam, L., El Safi, S. H., Presber, W. H., Schönián, G. (2001). *Leishmania donovani*: Intraspecific Polymorphisms of Sudanese Isolates Revealed by PCR-based Analyses and DNA Sequencing, *Exp. Parasitol.*, **97**(1): 35–44.
- El Tai, N. O., Osman, O. F., El Fari, M., Presber, W., Schonian, G. (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. England*, **94**(5): 575–579.
- Esseghir, S., Ready, P. D., Ben-Ismaïl, R. (2000). Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larrousius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion, *Biol. J. Linn. Soc. L.*, **70**(2): 189–219.
- Esseghir, S., Ready, P. D., Killick-Kendrick, R., Ben-Ismaïl, R. (1997). Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*., *Insect Mol. Biol.*, **6**(3): 211–225.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study., *Mol. Ecol. England*, **14**(8): 2611–2620.
- Farkas, R., Tánzos, B., Bongiorno, G., Maroli, M., Dereure, J., Ready, P. D. (2011). First surveys to investigate the presence of canine leishmaniasis and its phlebotomine vectors in Hungary., *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **11**(7): 823–834.
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2), *Cladistics*, **5**: 164–166.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP. Phylogenetic inference package, Version 3.5c. Seattle: Department of genetics; University of Washington.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Bardagi, M., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L. (2006). Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain., *Vet. Parasitol. Netherlands*, **135**(2): 181–185.
- Fernández-Cuenca, F., López-Cerero, L., Pascual-Hernández, A. (2013). Molecular typing methods for infection monitoring and control, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Spain*, **31 Suppl 1**: 20–25.
- Ferroglio, E., Maroli, M., Gastaldo, S., Mignone, W., Rossi, L. (2005). Canine leishmaniasis, Italy., *Emerg. Infect. Dis.* United States, **11**(10): 1618–1620.
- Fisa, R., Gallego, M., Castillejo, S., Aisa, M. J., Serra, T., Riera, C., Carrio, J., Gallego, J., Portus, M. (1999). Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus., *Vet. Parasitol. Netherlands*, **83**(2): 87–97.
- Florin, D. A., Rebollar-Tellez, E. A. (2013). Divergence of *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) *shannoni* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) is indicated by morphometric and molecular analyses when examined between taxa from the southeastern United States and southern Mexico., *J. Med. Entomol. England*, **50**(6): 1324–1329.
- Folgueira, C., Cañavate, C., Chicharro, C., Requena, J. M. (2007). Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species., *Parasitology. England*, **134**(Pt 3): 369–377.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates., *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* United States, **3**(5): 294–299.

- Foxman, B., Riley, L. (2001). Molecular epidemiology: focus on infection., *Am. J. Epidemiol.* United States, **153**(12): 1135–1141.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J.-C., Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene., *Infect. Genet. Evol.*, **10**(2): 238–245.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., Van der Auwera, G., Maes, I., Dujardin, J.-C., Requena, J. M. (2013). Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene., *Infect. Genet. Evol.* Netherlands, **18**: 229–237.
- Franco, F. A. L., Morillas-márquez, F., Barón, S. D., Morales-yuste, M., Gálvez, R., Díaz, V., Pesson, B., Alves-pires, C., Depaquit, J., Molina, R., Afonso, M. O., Gállego, M., Guernaoui, S., Bounamous, A., Martín-Sánchez, J. (2010). Genetic structure of *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: epidemiological implications., *Int J Parasitol*, **40**(11): 1335–1346.
- Gallego-Berenguer, J. (2003). Mastigóforos hemotisulares. Orden kinetoplástida, *Man. Parasitol. Morfol. y Biol. los parásitos interés Sanit.* Universitat de Barcelona, 148–165.
- Gallego-Berenguer, J., Botet-Fregola, J., Gallego-Culleré, M., Portús-Vinyeta, M. (1992). Los flebótomos en España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Información sobre los métodos de captura., *En 'In memoriam' al Profr. Dr. D.F. P. Martínez Gómez*, **58**: 597p.
- Gallego, M. (2004). Emerging parasitic zoonoses: leishmaniosis, *Rev. Sci. Tech.* France, **23**(2): 661–676.
- Gallego, M., Pratlong, F., Fisa, R., Riera, C., Rioux, J. A., Dedet, J. P., Portus, M. (2001). The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* England, **95**(3): 269–271.
- Gálvez, R., Descalzo, M. A., Guerrero, I., Miro, G., Molina, R. (2011). Mapping the current distribution and predicted spread of the leishmaniosis sand fly vector in the madrid region (Spain) based on environmental variables and expected climate change., *Vector Borne Zoonotic Dis.* United States, **11**(7): 799–806.
- Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M. A., Nieto, J., Dado, D., Martín, O., Cubero, E., Molina, R. (2010). Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain), *Vet. Parasitol.*, **169**(3–4): 327–334.
- García, N., Moreno, I., Álvarez, J., de la Cruz, M. L., Navarro, A., Perez-Sancho, M., Garcia-Seco, T., Rodriguez-Bertos, A., Conty, M. L., Torano, A., Prieto, A., Dominguez, L., Dominguez, M. (2014). Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain., *Biomed Res. Int.* United States, 318–254.
- Garin, Y. J., Sulahian, A., Pratlong, F., Meneceur, P., Gangneux, J. P., Prina, E., Dedet, J. P., Derouin, F. (2001). Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections., *Infect. Immun.* United States, **69**(12): 7365–7373.
- Gil-Collado, J., Morillas-Márquez, F., Sánchis-Marín, M. C. (1989). Los flebótomos en España. *Rev Sanid Hig Publica (Madr.)*, (63): 15–34.
- Gil-Prieto, R., Walter, S., Alvar, J., de Miguel, A. G. (2011). Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008)., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* United States, **85**(5): 820–825.
- Giorgobiani, E., Lawyer, P. G., Babuadze, G., Dolidze, N., Jochim, R. C., Tskhvaradze, L., Kikaleishvili, K., Kamhawi, S. (2012). Incrimination of *Phlebotomus kandelakii* and *Phlebotomus balcanicus* as vectors of *Leishmania infantum* in Tbilisi, Georgia., *PLoS Negl. Trop. Dis.* United States, **6**(4): e1609.
- Glez-Peña, D., Gómez-Blanco, D., Reboiro-Jato, M., Fdez-Riverola, F., Posada, D. (2010). ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments., *Nucleic Acids Res.* England, **38**(Web Server issue): W14-8.
- González, C., Wang, O., Strutz, S. E., González-Salazar, C., Sánchez-Cordero, V., Sarkar, S. (2010). Climate change and risk of leishmaniasis in north america: predictions from ecological niche models

- of vector and reservoir species., *PLoS Negl. Trop. Dis.* United States, **4**(1): e585.
- Gouzelou, E., Haralambous, C., Antoniou, M., Christodoulou, V., Martinkovic, F., Zivicnjak, T., Smirlis, D., Pratlong, F., Dedet, J.-P., Ozbel, Y., Toz, S. O., Presber, W., Schonian, G., Soteriadou, K. (2013). Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis., *Parasit. Vectors.* England, **6**: 342.
- Gradoni, L. (2013). Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: operational and research challenges., *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull. Sweden*, 20539.
- Gramiccia, M. (2003). The identification and variability of the parasites causing leishmaniasis in HIV-positive patients in Italy., *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **97 Suppl 1**(1): 65–73.
- Gramiccia, M., Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control, *Int. J. Parasitol.*, **35**(11–12): 1169–1180.
- Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T., Orsini, S., Fiorentino, E., Gradoni, L. (2013). The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009., *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull. Sweden*, **18**(29): 20535.
- Grimm, F., Gessler, M., Jenni, L. (1993). Aspects of sandfly biology in southern Switzerland., *Med. Vet. Entomol.* England, **7**(2): 170–176.
- Guerbouj, S., Victoir, K., Guizani, I., Seridi, N., Nuwayri-Salti, N., Belkaid, M., Ismail, R. B., Le Ray, D., Dujardin, J. C. (2001). Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure?, *Parasitology.* England, **122 Pt 1**: 25–35.
- Guernaoui, S., Pesson, B., Boumezzough, A., Pichon, G. (2005). Distribution of phlebotomine sandflies, of the subgenus *Larrousius*, in Morocco., *Med. Vet. Entomol.* England, **19**(1): 111–115.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0., *Syst. Biol.* England, **59**(3): 307–321.
- Gupta, S., Anderson, R. M. (1999). Population structure of pathogens: The role of immune selection, *Parasitol. Today*, **15**(12): 497–501.
- Guy, M. W., Killick-Kendrick, R., Gill, G. S., Rioux, J. A., Bray, R. S. (1984). Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cevennes by bloodmeal analyses., *Ann. Parasitol. Hum. Comp. France*, **59**(5): 449–458.
- Hall, B. G. (2011). *Phylogenetic Trees Made Easy*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 95–98.
- Hamarsheh, O., Presber, W., Abdeen, Z., Sawalha, S., Al-Lahem, A., Schönián, G. (2007). Genetic structure of Mediterranean populations of the sandfly *Phlebotomus papatasi* by mitochondrial cytochrome b haplotype analysis, *Med. Vet. Entomol.*, (21): 270–277.
- Haralambous, C., Antoniou, M., Pratlong, F., Dedet, J. P., Soteriadou, K. (2008). Development of a molecular assay specific for the *Leishmania donovani* complex that discriminates *L. donovani/Leishmania infantum* zymodemes: a useful tool for typing MON-1, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **60**(1): 33–42.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., DeWaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes., *Proc. Biol. Sci.*, **270**(1512): 313–21.
- Hebert, P. D. N., Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy., *Syst. Biol.* England, **54**(5): 852–859.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*.,

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. United States*, **101**(41): 14812–14817.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., Waard, J. (2003b). Barcoding animal life : cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **270**(figure 1): S96–S99.
- Hepburn, N. C. (2003). Cutaneous leishmaniasis: an overview., *J. Postgrad. Med. India*, **49**(1): 50–54.
- Herrador, Z., Gherasim, A., Jiménez, B. C., Granados, M. del sol, San Martín, J. V., Aparicio, P. (2015). Epidemiological changes in leishmaniasis in Spain according to hospitalization-based records, 1997–2011: raising awareness towards leishmaniasis in non-HIV patients., *PLoS Negl. Trop. Dis. United States*, **9**(3): e0003594.
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis., *Lancet (London, England)*. England, **354**(9185): 1191–1199.
- Hide, M., Bañuls, A. L. (2008). Polymorphisms of cpb multicopy genes in the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex, 106–107.
- Hillis, D. M., Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference., *Q. Rev. Biol. United States*, **66**(4): 411–453.
- Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Franco-Paredes, C., Ault, S. K., Periago, M. R. (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination., *PLoS Negl. Trop. Dis. United States*, **2**(9): e300.
- Hubert, N., Hanner, R. (2015). DNA Barcoding , species delineation and taxonomy : a historical perspective, *DNA Barcodes*, **3**: 44–58.
- Ibrahim, M. K., Barnes, J. L., Anstead, G. M., Jimenez, F., Travi, B. L., Peniche, A. G., Osorio, E. Y., Ahuja, S. S., Melby, P. C. (2013). The malnutrition-related increase in early visceralization of *Leishmania donovani* is associated with a reduced number of lymph node phagocytes and altered conduit system flow., *PLoS Negl. Trop. Dis. United States*, **7**(8): e2329.
- Inga, R., De Doncker, S., Gomez, J., Lopez, M., Garcia, R., Le Ray, D., Arevalo, J., Dujardin, J. C. (1998). Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Viannia*., *Mol. Biochem. Parasitol. Netherlands*, **92**(2): 219–228.
- IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) and Nomenclature Committee of IUBMB (NC-IUBMB), newsletter 1999. (1999)., *Eur. J. Biochem. England*, **264**(2): 607–609.
- Ivens, A. C., Lewis, S. M., Bagherzadeh, A., Zhang, L., Chan, H. M., Smith, D. F. (1998). A physical map of the *Leishmania major* Friedlin genome., *Genome Res. United States*, **8**(2): 135–145.
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., *et al.* (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*., *Science. United States*, **309**(5733): 436–442.
- Jacob, D. (2008). Short communication on regional climate change scenarios and their possible use for impact studies on vector-borne diseases., *Parasitol. Res. Germany*, **103 Suppl 1**: S3–6.
- Jamjoom, M. B., Ashford, R. W., Bates, P. A., Chance, M. L., Kemp, S. J., Watts, P. C., Noyes, H. A. (2004). *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and '*L. archibaldi*' from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data., *Parasitology. England*, **129**(Pt 4): 399–409.
- Jimenez, M., Ferrer-Dufol, M., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Molina, R., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Cercenado, E., Dauden, E., Blazquez, J. (1995). Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain., *FEMS Microbiol. Lett. England*, **131**(2): 197–204.
- Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F., Molina, R. (2013). Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid , Spain, *Parasitol Res.*, **112**(7): 2453–9.
- Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R. (2014). *Could wild rabbits*

- (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain?, *Vet. Parasitol.*
- Jinbo, U., Kato, T., Ito, M. (2011). Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology, *Entomol. Sci.*, **14**(2): 107–124.
- Jonsson, N. N., Reid, S. W. (2000). Global climate change and vector borne diseases., *Vet. J. England*, 87–89.
- Kaszak, I., Planellas, M., Dworecka-Kaszak, B. (2015). Canine leishmaniosis - an emerging disease., *Ann. Parasitol. Poland*, **61**(2): 69–76.
- Kato, H., Gomez, E. A., Cáceres, A. G., Uezato, H. (2010). Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis, **7**: 814–826.
- Kemp, D. J., Coppel, R. L., Anders, R. F. (1987). Repetitive proteins and genes of malaria., *Annu. Rev. Microbiol. United States*, **41**: 181–208.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review., *Med. Vet. Entomol. England*, **4**(1): 1–24.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies., *Clin. Dermatol. United States*, **17**(3): 279–289.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M. (1987). Honeydew of aphids as a source of sugar for *Phlebotomus ariasi*., *Med. Vet. Entomol. England*, **1**(3): 297–302.
- Killick-Kendrick, R., Tang, Y., Killick-Kendrick, M., Sang, D. K., Sirdar, M. K., Ke, L., Ashford, R. W., Schorscher, J., Johnson, R. H. (1991). The identification of female sandflies of the subgenus *Larrousius* by the morphology of the spermathecal ducts., *Parassitologia. Italy*, **33 Suppl**: 335–347.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences., *J. Mol. Evol. Germany*, **16**(2): 111–120.
- Krenn, H. W., Aspöck, H. (2012). Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda., *Arthropod Struct. Dev. England*, **41**(2): 101–118.
- Krüger, A., Strüven, L., Post, R. J., Faulde, M. (2011). The sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in military camps in northern Afghanistan (2007–2009), as identified by morphology and DNA “barcoding”., *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **105**(2): 163–176.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Canavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J.-P., Mauricio, I., Miles, M., Schaar, M., Ochsenreither, S., Radtke, O. A., Schonian, G. (2008). Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1., *PLoS Negl. Trop. Dis. United States*, **2**(7): e261.
- Kuhls, K., Mauricio, I. L., Pratlong, F., Presber, W., Schöni, G. (2005). Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex, *Microbes Infect.*, **7**(11–12): 1224–1234.
- Kumar, N. P., Srinivasan, R., Jambulingam, P. (2012). DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera : Psychodidae) in India, *Mol Ecol Resour.*, (3): 414–20.
- Kumar, S., Filipowski, A. (2007). Multiple sequence alignment: in pursuit of homologous DNA positions., *Genome Res. United States*, **17**(2): 127–135.
- Lachaud, L., Bourgeois, N., Kuk, N., Morelle, C., Crobu, L., Merlin, G., Bastien, P., Pages, M., Sterkers, Y. (2014). Constitutive mosaic aneuploidy is a unique genetic feature widespread in the *Leishmania* genus., *Microbes Infect. France*, **16**(1): 61–66.
- Laffitte, M.-C. N., Leprohon, P., Papadopoulou, B., Ouellette, M. (2016). Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance., *F1000Research. England*, **5**: 2350.
- Lainson, R., Ryan, L., Shaw, J. J. (1987). Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Brazil*, **82**(3): 421–424.

- Lane, R. P., Crosskey, R. W. (1993). *Medical Insects and Arachnids*. Lane RP and Crossey RW.
- Lanteri, A. A. (2007). Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología., *Rev. Soc. Entomol.*, **66**(3-4): 15-25.
- Latrofa, M. S., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Traversa, D., Otranto, D. (2012). Towards a rapid molecular identification of the common phlebotomine sand flies in the Mediterranean region., *Vet. Parasitol. Netherlands*, **184**(2-4): 267-270.
- Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Tarallo, V. D., Parisi, A., Traversa, D., Otranto, D. (2011). Multilocus molecular and phylogenetic analysis of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Italy., *Acta Trop. Netherlands*, **119**(2-3): 91-98.
- Laurent, T., Van der Auwera, G., Hide, M., Mertens, P., Quispe-Tintaya, W., Deborggraeve, S., De Doncker, S., Leclipteux, T., Banuls, A.-L., Buscher, P., Dujardin, J.-C. (2009). Identification of Old World *Leishmania* spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis. United States*, **63**(2): 173-181.
- Léger, N., Depaquit, J., Ferte, H., Rioux, J. A., Gantier, J. C., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Michaelides, A., Christophi, N., Economides, P. (2000). Phlebotomine sandflies (Diptera-Psychodidae) of the isle of Cyprus. II--Isolation and typing of *Leishmania* (*Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (zymodeme MON 1) from *Phlebotomus* (*Larroussius*) *tobbi* Adler and Theodor, 1930, *Parasite*. France, **7**(2): 143-146.
- Léger, N., Gramiccia, M., Gradoni, L., Madulo-Leblond, G., Pesson, B., Ferte, H., Boulanger, N., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M. (1988). Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the island of Corfu, Greece., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. England*, **82**(3): 419-420.
- Leite, R. S., Souza, N. A., Barbosa, A. D., Ferreira, A. L. C., de Andrade, A. S. R. (2015). Evaluation of conjunctival swab as a mass-screening tool for molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis., *Parasitol. Res. Germany*, **114**(6): 2255-2262.
- Leontides, L. S., Saridomichelakis, M. N., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A. F., Galatos, A. D., Mylonakis, M. E. (2002). A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece., *Vet. Parasitol. Netherlands*, **109**(1-2): 19-27.
- Lewis, D. J. (1978). Phlebotomie sand flies (Diptera: Psychodidae) of the oriental region., *Bull. World Heal. Organ.*, **37**: 1-343.
- Lewis, D. J. (1987). Depth of penetration of vertebrate skin by phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae), *Ann. Trop. Med. Parasitol. England*, **81**(2): 173-179.
- Lewis, D. J., Young, D. G., Fairchild, G. B., Minter, D. M. (1977). Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae), *Syst. Entomol. Blackwell Publishing Ltd*, **2**(4): 319-332.
- Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data., *Bioinformatics. England*, **25**(11): 1451-1452.
- Llanes-Acevedo, I. P., Cruz, I., Albertini, A., Rivas, L. (2015). Leishmaniasis. En Rodríguez y Rubio. Diagnóstico de las enfermedades desatendidas: moléculas y trópico. Grupo Editorial. Sial Pigmalión, S.L, 48-67.
- Llanes-Acevedo, I.P., Arcones, C., Gálvez, R., Martín, O., Checa, R., Montoya, A., Chicharro, C., Cruz, S., Miró, G., Cruz, I. (2016). DNA sequence analysis suggests that cytb-nd1 PCR-RFLP may not be applicable to sandfly species identification throughout the Mediterranean region. *Parasitol Res.* **115**(3):1287-95.
- López-Vélez, R., Casado, J. L., Pintado, V. (2001). Decline of a visceral leishmaniasis epidemic in HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART)., *Clin. Microbiol. Infect. England*, 394-395.
- López-Vélez, R., Molina Moreno, R. (2005). Climate change in Spain and risk of infectious and parasitic

- diseases transmitted by arthropods and rodents., *Rev. Esp. Salud Publica*. Spain, **79**(2): 177–190.
- Löytynoja, A., Goldman, N. (2008). Phylogeny-aware gap placement prevents errors in sequence alignment and evolutionary analysis., *Science*. United States, **320**(5883): 1632–1635.
- Lucientes, J., Osacar, J. J., Calvete, C., Benito, I., Castillo, J. A. (1994). Sobre la presencia de *Phlebotomus (Larrousious) langeroni* Nitzulescu, 1930, (Diptera: Psychodidae) en Aragón, *Rev Aragon Entomol.*, **4**: 19–22.
- Machado, P., Araujo, C., Da Silva, A. T., Almeida, R. P., D'Oliveira Jr, A., Bittencourt, A., Carvalho, E. M. (2002). Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer., *Clin. Infect. Dis*. United States, **34**(12): E69–73.
- Mahamdallie, S. S., Pesson, B., Ready, P. D. (2011). Multiple genetic divergences and population expansions of a Mediterranean sandfly, *Phlebotomus ariasi*, in Europe during the Pleistocene glacial cycles., *Heredity (Edinb)*., **106**(5): 714–26.
- Maia, C., Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis?, *Trends Parasitol*. England, **27**(8): 341–344.
- Maia, C., Nunes, M., Campino, L. (2008). Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal., *Vector Borne Zoonotic Dis*. United States, **8**(4): 555–559.
- Maia, C., Parreira, R., Cristovao, J. M., Afonso, M. O., Campino, L. (2015). Exploring the utility of phylogenetic analysis of cytochrome oxidase gene subunit I as a complementary tool to classical taxonomical identification of phlebotomine sand fly species (Diptera, Psychodidae) from southern Europe., *Acta Trop*. Netherlands, **144**: 1–8.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. United States, **95**(6): 3140–3145.
- Marco, J. D., Barroso, P. A., Locatelli, F. M., Cajal, S. P., Hoyos, C. L., Nevot, M. C., Lauthier, J. J., Tomasini, N., Juarez, M., Estevez, J. O., Korenaga, M., Nasser, J. R., Hashiguchi, Y., Ruybal, P. (2015). Multilocus sequence typing approach for a broader range of species of *Leishmania* genus: describing parasite diversity in Argentina., *Infect. Genet. Evol*. Netherlands, **30**: 308–317.
- Marín-Iniesta, F., Marín-Iniesta, E., Martín-Luengo, F. (1982). Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la región murciana, *Rev. Ibér. Parasitol*, **42**(42): 307–313.
- Marín, C., Longoni, S., Sanchez-Moreno, M. (2013). '*Leishmania*': molecular detection of human parasitic pathogens.
- Marlow, M. A., Boite, M. C., Ferreira, G. E. M., Steindel, M., Cupolillo, E. (2014). Multilocus sequence analysis for *Leishmania braziliensis* outbreak investigation., *PLoS Negl. Trop. Dis*. United States, **8**(2): e2695.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern., *Med. Vet. Entomol*. England, **27**(2): 123–147.
- Maroli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L. (1987). Natural infection of *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. England, **81**(4): 596–598.
- Maroli, M., Pennisi, M. G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*., *Vet. Parasitol*. Netherlands, **145**(3–4): 357–360.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglia, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L. (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors., *Trop. Med. Int. Health*. England, **13**(2): 256–264.
- Maroof, A., Brown, N., Smith, B., Hodgkinson, M. R., Maxwell, A., Losch, F. O., Fritz, U., Walden, P.,

- Lacey, C. N. J., Smith, D. F., Aebischer, T., Kaye, P. M. (2012). Therapeutic Vaccination With Recombinant Adenovirus Reduces Splenic Parasite Burden in Experimental Visceral Leishmaniasis, *Ther. Vaccine Leishmaniasis*, **205**: 853–863.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain., *Vet. Parasitol. Netherlands*, **145**(3–4): 267–273.
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Márquez, F. (2004). Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **98**(4): 228–232.
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Pesson, B., Morillas-Márquez, F. (2000). Genetic polymorphism in sympatric species of the genus *Phlebotomus*, with special reference to *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera, Phlebotomidae)., *Parasite. France*, **7**(4): 247–254.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V., Morillas-Márquez, F. (2009). Canine leishmaniasis in southeastern Spain., *Emerg. Infect. Dis. United States*, **15**(5): 795–798.
- Mateo, M., Cruz, I., Flores, M. D., López-Vélez, R. (2005). Slowly progressing skin ulcers following a stay in Costa Rica, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Spain*, **23**(4): 243–244.
- Mau, B., Newton, M. A., Larget, B. (1999). Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods., *Biometrics. United States*, **55**(1): 1–12.
- Mauricio, I. L., Gaunt, M. W., Stothard, J. R., Miles, M. A. (2001). Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions., *Parasitology. England*, **122**(Pt 4): 393–403.
- Mauricio, I. L., Yeo, M., Baghaei, M., Doto, D., Pratlong, F., Zemanova, E., Dedet, J. P., Lukes, J., Miles, M. A. (2006). Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: Resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD), *Int. J. Parasitol.*, **36**(7): 757–769.
- Mazeris, A., Soteriadou, K., Dedet, J. P., Haralambous, C., Tsatsaris, A., Moschandreas, J., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Papadopoulos, B., Ivovic, V., Pratlong, F., Loucaides, F., Antoniou, M. (2010). Leishmaniasis and the Cyprus paradox., *Am. J. Trop. Med. Hyg. United States*, **82**(3): 441–448.
- McCoy, K. D. (2008). The population genetic structure of vectors and our understanding of disease epidemiology., *Parasite. France*, **15**(3): 444–448.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Van Bortel, W., Zeller, H., Alten, B. (2014). A summary of the evidence for the change in European distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of public health importance., *J. Vector Ecol.*, **39**(1): 72–77.
- Mencke, N. (2011). The importance of canine leishmaniosis in non-endemic areas, with special emphasis on the situation in Germany., *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. Germany*, **124**(11–12): 434–442.
- Meyer, C. P., Paulay, G. (2005). DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling, *PLoS Biol.*, **3**(12): 1–10.
- Michel, G., Pomares, C., Ferrua, B., Marty, P. (2011). Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (L. chagasi) in human., *Acta Trop. Netherlands*, **119**(2–3): 69–75.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E. (2011). An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain)., *Transbound. Emerg. Dis. Germany*, **58**(4): 352–357.
- Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Gálvez, R. (2012). Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain, *Parasit. Vectors*, **5**(1): 60.
- Miró, G., Molina, R. (2006). Leishmaniosis canina: Manejo clínico y situación actual en España. Bayer HealthCare. Madrid: Graficas SYL.
- Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., Garcia, S., Garcia, A., Caballero, M. J., Molina, R. (2007).

- A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006)., *Parasitol. Res. Germany*, **101**(2): 253–257.
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Galvez, R., Sainz, A. (2013). Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study., *Parasit. Vectors*. England, **6**: 117.
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V., Montoya, A. (2014). Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis?, *Parasit. Vectors*, 112.
- Moin-vaziri, V., Yaghoobi-ershadi, M., Oshaghi, M., Derakhshandeh-peykar, P., Fert, H., Dolores, M., Nicole, L., Nadim, A. (2007). Intraspecific variation within *Phlebotomus sergenti* Parrot (1917) (Diptera : Psychodidae) based on mtDNA sequences in Islamic Republic of Iran, **102**(1): 29–37.
- Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain, *Vet. Parasitol.* Elsevier B.V., **190**(1–2): 268–271.
- Momen, H., Cupolillo, E. (2000). Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Brazil, **95**(4): 583–588.
- Monge-Maillo, B., Norman, F. F., Cruz, I., Alvar, J., Lopez-Velez, R. (2014). Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region., *PLoS Negl. Trop. Dis.* United States, **8**(8): e3021.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J.-C., Van der Auwera, G. (2012). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Germany, **31**(7): 1453–1461.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., Dujardin, J. C., Van der Auwera, G. (2010). Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World., *Parasitology*. England, **137**(8): 1159–1168.
- Montoya, A., de Quadros, L. P., Mateo, M., Hernández, L., Gálvez, R., Alcantara, G., Checa, R., Jiménez, M. A., Chicharro, C., Cruz, I., Miró, G. (2016). *Leishmania infantum* infection in bennett's wallabies (*macropus rufogriseus rufogriseus*) in a spanish wildlife park., *J. Zoo Wildl. Med.* United States, **47**(2): 586–593.
- Morales-Hernández, M. Á. (2002). Epidemiología molecular de la co-infección con *Leishmania* y VIH. Universidad Complutense de Madrid.
- Morales-Yuste, M., Morillas-Marquez, F., Diaz-Saez, V., Baron-Lopez, S., Acedo-Sanchez, C., Martin-Sanchez, J. (2012). Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios., *Parasitol. Res. Germany*, **111**(1): 155–164.
- Moreno, I., Álvarez, J., García, N., de la Fuente, S., Martínez, I., Marino, E., Toraño, A., Goyache, J., Vilas, F., Domínguez, L., Domínguez, M. (2014). Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test, *Vet. Parasitol.*, **199**(3–4): 264–267.
- Moreno, J., Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model., *Trends Parasitol.* England, **18**(9): 399–405.
- Morillas-Márquez, F., Benavides-Delgado, I., González-Castro, J., Reyes-Magaña, A., Valero-López, A. (1985). Occurrence of *Leishmania* spp. in *Rattus rattus* in the province of Granada, *Ann Parasitol Hum Comp*, **60**: 768–770.
- Morillas-Márquez, F., Sánchez-Rabasco, F., Martín-Sánchez, J., Ocaña-Wihelmi, J., Acedo-Sánchez, C., Sanchiz-Marín, M. C. (1996). Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector., *Parasitol. Res. Germany*, **82**(6): 569–570.
- Morillas-Márquez, F., Sanchis-Marín, M. C., Martín-Sánchez, J., Acedo-Sánchez, C. (1991). On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the Province of Almeria in southeastern Spain., *Parassitologia*. Italy, **33** Suppl: 437–444.
- Morosetti, G., Bongiorno, G., Beran, B., Scalone, A., Moser, J., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M.

- (2009). Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy., *Geospat. Health*. Italy, **4**(1): 115–127.
- Müller, G., Schlein, Y. (2004). Nectar and honeydew feeding of *Phlebotomus papatasi* in a focus of *Leishmania major* in Neot Hakikar oasis., *J. Vector Ecol.* United States, **29**(1): 154–158.
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrino, J., Parejo, J. C., Serrano, F. J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L. C. (2013). First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs., *Acta Trop.* Netherlands, **128**(3): 706–709.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis., *Lancet (London, England)*. England, **366**(9496): 1561–1577.
- Myskova, J., Svobodova, M., Beverley, S. M., Volf, P. (2007). A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies., *Microbes Infect.* France, **9**(3): 317–324.
- Naucke, T. J., Amelung, S., Lorentz, S. (2016). First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany., *Parasit. Vectors*. England, **9**(1): 256.
- Naucke, T. J., Menn, B., Massberg, D., Lorentz, S. (2008). Sandflies and leishmaniasis in Germany., *Parasitol. Res.* Germany, **103 Suppl**: S65-8.
- Naucke, T. J., Schmitt, C. (2004). Is leishmaniasis becoming endemic in Germany?, *Int. J. Med. Microbiol.* Germany, **293 Suppl**: 179–181.
- Navea-Pérez, H. M., Díaz-Saez, V., Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J. (2015). *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts?, *Parasitol. Res.* Germany, **114**(6): 2363–2370.
- Negrisoló, E., Babbucci, M., Patarnello, T. (2011). The mitochondrial genome of the ascalaphid owlfly *Libelloides macaronius* and comparative evolutionary mitochondriomics of neuropterid insects., *BMC Genomics*, **12**(1): 221.
- Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Neuber, H. (2008). Leishmaniasis., *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* Germany, **6**(9): 754–765.
- Nzelu, C. O., Caceres, A. G., Arrunategui-Jimenez, M. J., Lanas-Rosas, M. F., Yanez-Trujillano, H. H., Luna-Caipe, D. V., Holguin-Mauricci, C. E., Katakura, K., Hashiguchi, Y., Kato, H. (2015). DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru., *Acta Trop.* Netherlands, **145**: 45–51.
- Ochsenreither, S., Kuhls, K., Schaar, M., Presber, W., Schönián, G. (2006). Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains, *J. Clin. Microbiol.*, **44**(2): 495–503.
- Odds, F. C. (2010). Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*., *Future Microbiol.* England, **5**(1): 67–79.
- Oshaghi, M. ., Absavaran, A., Rassi, Y., Parvizi, P. (2009). Identification of sandflies of the subgenus *Larroussius* based on molecular and morphological characters, *J. Med. Entomol. Tehran Univ. Med. Sci. Ghods, Enghelab, Tehran, Iran*, 14155–6446.
- Oshaghi, M. A., Chavshin, A. R., Vatandoost, H. (2006). Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers., *Exp. Parasitol.* United States, **114**(4): 259–264.
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., Hanner, R. (2009). DNA barcoding and the mediocrity of morphology, *Mol. Ecol. Resour.*, **9**(SUPPL. 1): 42–50.
- Pagliano, P., Carannante, N., Rossi, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., Faella, F. S., Gaeta, G. B. (2005). Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature., *J. Antimicrob. Chemother.* England, **55**(2): 229–233.
- Palatnik-de-Sousa, C. B., Day, M. J. (2011). One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis., *Parasit. Vectors*. England, **4**: 197.

- Pampiglione, S., Manson-Bahr, P. E., Giungi, F., Giunti, G., Parenti, A., Canestri Trotti, G. (1974). Studies on Mediterranean leishmaniasis. 2. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. England*, **68**(6): 447–453.
- Papadogiannakis, E., Spanakos, G., Kontos, V., Menounos, P. G., Tegos, N., Vakalis, N. (2010). Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece., *Zoonoses Public Health*. Germany, **57**(7–8): e23–5.
- Parvizi, P., Benlarbi, M., Ready, P. D. (2003). Mitochondrial and *Wolbachia* markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi*: Little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, Iran, *Med. Vet. Entomol.*, **17**(4): 351–362.
- Parvizi, P., Moradi, G., Akbari, G., Farahmand, M., Ready, P. D., Piazak, N., Assmar, M., Amirkhani, A. (2008). PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran, *Parasitol. Res.*, **103**(6): 1273–1278.
- Paterson, S., Viney, M. E. (2000). The interface between epidemiology and population genetics., *Parasitol. Today*. England, **16**(12): 528–532.
- Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M.-A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., *et al.* (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease., *Nat. Genet.* United States, **39**(7): 839–847.
- Pennisi, M. G. (2015). Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update., *Vet. Parasitol.* Netherlands, **208**(1–2): 35–47.
- Pennisi, M. G., Hartmann, K., Lloret, A., Addie, D., Belak, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M. J., Lutz, H., Marsilio, F., Mostl, K., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M. C. (2013). Leishmaniosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management., *J. Feline Med. Surg.* England, **15**(7): 638–642.
- Pigott, D. M., Bhatt, S., N., G., K. A. Duda, K. E. Battle, O. J., Brady, J. P. M. et al (2014). Global distribution maps of the Leishmaniases, *Elife*, **2014**(3): 1–21.
- Pinto Ide, S., Chagas, B. D. das, Rodrigues, A. A. F., Ferreira, A. L., Rezende, H. R., Bruno, R. V., Falqueto, A., Andrade-Filho, J. D., Galati, E. A. B., Shimabukuro, P. H. F., Brazil, R. P., Peixoto, A. A. (2015). DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Species Identification and Discovery within Brazil., *PLoS One*. United States, **10**(10): e0140636.
- Pittaluga, G. (1912). Hallazgo de '*Leishmania infantum*' (protozoo parásito del 'Kala-azar infantil') en la costa de Levante de España, *Bol Inst Nac Hig Alfonso XIII*, **8**: 137–139.
- Pittaluga, G. (1913). Leishmaniosis espontánea del perro en la comarca de Tortosa, *Bol Soc Esp Biol*, **2**: 132–133.
- Pollock, K. G. J., McNeil, K. S., Mottram, J. C., Lyons, R. E., Brewer, J. M., Scott, P., Coombs, G. H., Alexander, J. (2003). The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses., *J. Immunol.* United States, **170**(4): 1746–1753.
- Polcela, R., Jaturas, N., Thanwisai, A., Sing, K. (2015). Towards monitoring the sandflies (Diptera : Psychodidae) of Thailand : DNA barcoding the sandflies of Wihan Cave , Uttaradit Towards monitoring the sandflies (Diptera : Psychodidae) of Thailand : DNA barcoding the sandflies of Wihan Cave , Uttaradit, *Mitochondrial DNA*, **1736**(September).
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M. J., Fisa, R., Castillejo, S. (2003). Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain)., *Lab. Parasitol. Fac. Pharmacy, Univ. Barcelona*, 72–76.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging., *Mol. Biol. Evol.* United States, 1253–1256.
- Pratlong, F., Dereure, J., Deniau, M., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dedet, J.-P. (2003). Enzymatic polymorphism during *Leishmania*/HIV co-infection: a study of 381 *Leishmania* strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier, France., *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **97 Suppl 1**(1): 47–56.

- Pratlong, F., Dereure, J., Ravel, C., Lami, P., Balard, Y., Serres, G., Lanotte, G., Rioux, J.-A., Dedet, J.-P. (2009). Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains., *Trop. Med. Int. Health*. England, **14**(9): 1071–1085.
- Pratlong, F., Lami, P., Ravel, C., Balard, Y., Dereure, J., Serres, G., Baidouri, F. E. L., Dedet, J.-P. (2013). Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains., *Parasitology*. England, **140**(4): 423–434.
- Pratlong, F., Rioux, J., Marty, P., Faraut-gambarelli, F., Dereure, J., Dedet, J. (2004). *Leishmania infantum* in the South of France Isoenzymatic Analysis of 712 Strains of Epidemiological Features Polymorphism to Clinical and and Relationship of Enzymatic Features, *J. Clin. Microbiol.*, **42**: 4077–4082.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data., *Genetics*. United States, **155**(2): 945–959.
- Prugnolle, F., Liu, H., de Meeus, T., Balloux, F. (2005). Population genetics of complex life-cycle parasites: an illustration with trematodes., *Int. J. Parasitol.* England, **35**(3): 255–263.
- Quispe-Tintaya, K. W., Ying, X., Dedet, J.-P., Rijal, S., De Bolle, X., Dujardin, J.-C. (2004). Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex., *J. Infect. Dis.* United States, **189**(6): 1035–1043.
- Ramesh, V., Mukherjee, A. (1995). Post-kala-azar dermal leishmaniasis., *Int. J. Dermatol.* England, **34**(2): 85–91.
- Ramírez, G. a, Peñafiel-Verdú, C., Altimira, J., García-González, B., Vilafranca, M. (2013). Naturally acquired visceral leishmaniosis in a captive Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus rufogriseus*)., *Vet. Pathol.*, **50**(1): 188–90.
- Ramos, A., Múñez, E., García-Domínguez, J., Martínez-Ruiz, R., Chicharro, C., Banos, I., Suárez-Massa, D., Cuervas-Mons, V. (2015). Mucosal leishmaniasis mimicking squamous cell carcinoma in a liver transplant recipient., *Transpl. Infect. Dis.* Denmark, **17**(3): 488–492.
- Randolph, S. E. (2009). Perspectives on climate change impacts on infectious diseases., *Ecology*. United States, **90**(4): 927–931.
- Ravel, C., Cortes, S., Pratlong, F., Morio, F., Dedet, J.-P., Campino, L. (2006). First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*., *Int. J. Parasitol.* England, **36**(13): 1383–1388.
- Ready, P. D. (2008). Leishmaniasis emergence and climate change., *Rev. Sci. Tech.* France, **27**(2): 399–412.
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe., *Euro Surveill. Bull. Eur. sur les Mal. Transm. = Eur. Commun. Dis. Bull.*, **15**(10): 19505.
- Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents, *Annu Rev Entomol*, **58**: 227–250.
- Reisen, W. K. (2010). Landscape epidemiology of vector-borne diseases., *Annu. Rev. Entomol.* United States, **55**: 461–483.
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis., *Lancet. Infect. Dis.* United States, **7**(9): 581–596.
- RENAVE (n.d.). Real decreto 2210/1995 (28 de diciembre de 1995), por la que se crea la red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Enfermedades endémicas de ámbito regional, AnexoIII.
- Rhajaoui, M., Fellah, H., Pratlong, F., Dedet, J. P., Lyagoubi, M. (2004). Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* MON-102 in a new Moroccan focus., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* England, **98**(5): 299–301.

- Ribeiro, J. M., Rossignol, P. A., Spielman, A. (1986). Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*., *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* England, **83**(4): 683–686.
- Rioux, J. A., Albaret, J. L., Houin, R., Dedet, J. P., Lanotte, G. (1968). Ecology of leishmaniasis in the south of France. 2. Selvatic reservoirs. Spontaneous infestation of the fox (*Vulpes vulpes*), *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* France, **43**(4): 421–428.
- Rioux, J. A., Killick-Kendrick, R., Leaney, A. J., Young, C. J., Turner, D. P., Lanotte, G., Bailly, M. (1979). Ecology of leishmaniasis in the south of France. 11. Canine leishmaniasis: successful experimental transmission from dog to dog by the bite of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 (author's transl)., *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* France, **54**(4): 401–407.
- Rioux, J. A., Killick-Kendrick, R., Perieres, J., Turner, D. P., Lanotte, G. (1980). Ecology of leishmaniasis in the south of France. 13. Middle slopes of hillsides as sites of maximum risk of transmission of visceral leishmaniasis in the Cevennes (author's transl), *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* France, **55**(4): 445–453.
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification., *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**(3): 111–125.
- Rivas-Martínez, S. (1983). Pisos bioclimáticos de España, *Lazaroa*, **43**(5): 33–43.
- Rivier, D., Bovay, P., Shah, R., Didisheim, S., Mauel, J. (1999). Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection., *Parasite Immunol.* England, **21**(9): 461–473.
- Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., Otto, T. D., Sanders, M., Seeger, K., Dujardin, J.-C., Berriman, M., Smith, D. F., Hertz-Fowler, C., Mottram, J. C. (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*., *Genome Res.* United States, **21**(12): 2129–2142.
- Romero-Ricardo, L., Lastre-Meza, N., Pérez-Doria, A., Bejarano, E. E. (2016). DNA barcoding to identify species of phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) in the mixed leishmaniasis focus of the Colombian Caribbean, *Acta Trop.*, **159**: 125–131.
- Rougeron, V., De Meeus, T., Kako Ouraga, S., Hide, M., Banuls, A.-L. (2010). ‘Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)’ in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses., *PLoS Pathog.* United States, **6**(8): e1001004.
- Ruiz-Fons, F., Ferroglio, E., Gortazar, C. (2013). *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004–2010., *Euro Surveill*, **18**(30): 20541.
- Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sa-Leao, R., van Dijl, J. m, Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A. W. (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance., *Euro Surveill*. **18**(4): 20380.
- Sadlova, J., Dvorak, V., Seblova, V., Warburg, A., Votpyka, J., Volf, P. (2013). *Sergentomyia schwetzi* is not a competent vector for *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species pathogenic to humans., *Parasit. Vectors.* England, **6**(1): 186.
- Sales, K. G. da S., Costa, P. L., de Moraes, R. C. S., Otranto, D., Brandao-Filho, S. P., Cavalcanti, M. de P., Dantas-Torres, F. (2015). Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR., *Parasit. Vectors.* England, **8**: 230.
- Salman, S. M., Rubeiz, N. G., Kibbi, A. G. (1999). Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis., *Clin. Dermatol.* United States, **17**(3): 291–296.
- Sanger, F., Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase., *J. Mol. Biol.* England, **94**(3): 441–448.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA., *Chromosoma.* Austria, **109**(6): 365–371.
- Schnur, L. F., Jacobson, R. L. (1989). Surface reaction of *Leishmania*. IV. Variation in the surface

- membrane carbohydrates of different strains of *Leishmania major*., *Ann. Trop. Med. Parasitol.* England, **83**(5): 455–463.
- Schönian, G., Kuhls, K., Mauricio, I. L. (2011). Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*, *Parasitology*, **138**(4): 405–425.
- Schönian, G., Mauricio, I., Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?, *Trends Parasitol.* England, **26**(10): 466–469.
- Schönian, G., Mauricio, I., Gramiccia, M., Cañavate, C., Boelaert, M., Dujardin, J. C. (2008). Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology, *Trends Parasitol.*, **24**(3): 135–142.
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H. D. F. H., Presber, W., Jaffe, C. L. (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* United States, **47**(1): 349–358.
- Schönian, G., Schnur, L., el Fari, M., Oskam, L., Kolesnikov, A. A., Sokolowska-Kohler, W., Presber, W. (2001). Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* England, **95**(2): 217–224.
- Secombe, A. K., Ready, P. D., Huddleston, L. M. (1993). A catalogue of Old World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae)., *Occ. Pap. Syst. Entomol.*, (8): 1–57.
- Semenza, J. C., Menne, B. (2009). Climate change and infectious diseases in Europe., *Lancet. Infect. Dis.* United States, **9**(6): 365–375.
- Sharma, U., Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: Distribution, physiology and their control, *J. Vector Borne Dis.*, **45**(4): 255–272.
- Shaw, S. E., Langton, D. A., Hillman, T. J. (2009). Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector?, *Vet. Parasitol.* Netherlands, **163**(4): 281–285.
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R., Lukeš, J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates, *Trends Parasitol.*, **22**(4): 168–174.
- Simpson, L., Neckelmann, N., de la Cruz, V. F., Simpson, A. M., Feagin, J. E., Jasmer, D. P., Stuart, K. (1987). Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence., *J. Biol. Chem.* United States, **262**(13): 6182–6196.
- Sobrinho, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M. C., Trisciuglio, A., Gortázar, C. (2008). Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain, *Vet. Parasitol.*, **155**(3–4): 198–203.
- Solano-Gallego, L., Fernandez-Bellon, H., Serra, R., Gallego, M., Ramis, A., Fondevila, D., Ferrer, L. (2003). Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain., *Equine Vet. J.* United States, **35**(3): 320–323.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis., *Vet. Parasitol.* Netherlands, **165**(1–2): 1–18.
- Solano-Gallego, L., Miro, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., Group, T. L. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis., *Parasit. Vectors.* England, **4**: 86.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology., *J. Clin. Microbiol.* United States, **39**(2): 560–563.
- Solano-Gallego, L., Rodriguez-Cortes, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portus, M., Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* United States, **76**(4): 676–680.
- Soto, M., Quijada, L., Larreta, R., Iborra, S., Alonso, C., Requena, J. M. (2003). *Leishmania infantum*

- possesses a complex family of histone H2A genes: structural characterization and analysis of expression., *Parasitology*. England, **127**(Pt 2): 95–105.
- Sterkers, Y., Crobu, L., Lachaud, L., Pages, M., Bastien, P. (2014). Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: alternative genetics., *Trends Parasitol.* England, **30**(9): 429–435.
- Strazzulla, A., Cocuzza, S., Pinzone, M. R., Postorino, M. C., Cosentino, S., Serra, A., Cacopardo, B., Nunnari, G. (2013). Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease., *Biomed Res. Int.* United States, **2013**: 805108.
- Struelens, M. J., Brisse, S. (2013). From molecular to genomic epidemiology: transforming surveillance and control of infectious diseases., *Euro Surveill.* 20386.
- Suárez-Rodríguez, B., Isidoro-Fernández, B., Santos-Sanz, S., Sierra-Moros, M. J., Molina-Moreno, R., Astray-Mochales, J., Amela-Heras, C. (2012). Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain, *Rev. Esp. Salud Publica*. Spain, **86**(6): 555–564.
- Tabbabi, A., Rhim, A., Ghrab, J., Martin, O., Aoun, K., Bouratbine, A., Ready, P. D. (2014). *Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi*: a synonym of *Phlebotomus chabaudi* without any proven vectorial role in Tunisia and Algeria., *Med. Vet. Entomol.* England, **28 Suppl 1**: 51–59.
- Tamar, S., Dumas, C., Papadopoulou, B. (2000). Chromosome structure and sequence organization between pathogenic and non-pathogenic *Leishmania* spp., *Mol. Biochem. Parasitol.* Netherlands, **111**(2): 401–414.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol. Biol. Evol.*, **28**(10): 2731–2739.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.*, **30**(12): 2725–2729.
- Tánczos, B., Balogh, N., Király, L., Biksi, I., Szeredi, L., Gyurkovsky, M., Scalone, A., Fiorentino, E., Gramiccia, M., Farkas, R. (2012). First Record of Autochthonous Canine Leishmaniasis in Hungary, *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, **12**(7): 588–594.
- Tashakori, M., Mahnaz, T., Kuhls, K., Katrin, K., Al-Jawabreh, A., Amer, A.-J., Mauricio, I. L., Isabel, M., Schönian, G., Gabriele, S., Farajnia, S., Safar, F., Alimohammadian, M. H., Hossein, A. M. (2006). *Leishmania major*: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer., *Acta Trop.*, **98**(1): 52–8.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., Vogler, A. P. (2002). DNA points the way ahead in taxonomy., *Nature*, **418**(September 2002): 479.
- Thompson, J., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, **22**(22): 4673–4680.
- Thompson, R. C. A., Kutz, S. J., Smith, A. (2009). Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues., *Int. J. Environ. Res. Public Health*. Switzerland, **6**(2): 678–693.
- Tibayrenc, M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms., *Adv. Parasitol.* England, **36**: 47–115.
- Tibayrenc, M. (1996). Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms., *Annu. Rev. Microbiol.* United States, **50**: 401–429.
- Tibayrenc, M. (1998). Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases., *Parasitol. Today*. England, **14**(8): 323–329.
- Tibayrenc, M., Ayala, F. J. (2002). The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on., *Trends Parasitol.* England, **18**(9): 405–410.
- Tibayrenc, M., Ayala, F. J. (2017). Is Predominant Clonal Evolution a Common Evolutionary Adaptation to Parasitism in Pathogenic Parasitic Protozoa, Fungi, Bacteria, and Viruses?, *Adv. Parasitol.*

- England, **97**: 243–325.
- Tomasini, N., Lauthier, J. J., Llewellyn, M. S., Diosque, P. (2013). MLSTest: novel software for multi-locus sequence data analysis in eukaryotic organisms., *Infect. Genet. Evol.* Netherlands, **20**: 188–196.
- Tsukayama, P., Lucas, C., Bacon, D. J. (2009). Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*., *Int. J. Parasitol.* England, **39**(3): 355–362.
- Upton, M. S. (1993). Aqueous gum-chloral slide mounting media : an historical review, *Bull Entomol Res*, (83): 267–274.
- Uribe, S., Lehmann, T., Rowton, E. D., Vélez, I., Porter, C. (2001). Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene., *Mol. , Phylogenetic Evol.*, **18**: 84–93.
- Van der Auwera, G., Dujardin, J.-C. (2015). Species typing in dermal leishmaniasis., *Clin. Microbiol. Rev.* United States, **28**(2): 265–294.
- Van der Auwera, G., Fraga, J., Montalvo, A. M., Dujardin, J.-C. (2011). *Leishmania* taxonomy up for promotion?, *Trends Parasitol.* England, 49–50.
- Van der Auwera, G., Maes, I., De Doncker, S., Ravel, C., Cnops, L., Van Esbroeck, M., Van Gompel, A., Clerinx, J., Dujardin, J. C. (2013). Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics., *Euro Surveill.* Sweden, **18**(30): 20543.
- Van Griensven, J., Carrillo, E., Lopez-Velez, R., Lynen, L., Moreno, J. (2014). Leishmaniasis in immunosuppressed individuals., *Clin. Microbiol. Infect.* England, **20**(4): 286–299.
- Van Walle, I. (2013). ECDC starts pilot phase for collection of molecular typing data., *Euro Surveill.* Sweden, **18** (3):20357.
- Varani, S., Cagarelli, R., Melchionda, F., Attard, L., Salvadori, C., Finarelli, A. C., Gentilomi, G. A., Tigani, R., Rangoni, R., Todeschini, R., Scalone, A., Di Muccio, T., Gramiccia, M., Gradoni, L., Viale, P., Landini, M. P. (2013). Ongoing outbreak of visceral leishmaniasis in Bologna Province, Italy, November 2012 to May 2013., *Euro Surveill.* **18** (29): 20530.
- Victoir, K., Banuls, A. L., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Hamers, R., Noel, S., De Doncker, S., Le Ray, D., Tibayrenc, M., Dujardin, J. C. (1998). The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*., *Parasitology.* England, **117** (Pt 1): 1–13.
- Victoir, K., Dujardin, J.-C. (2002). How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*., *Trends Parasitol.* England, **18**(2): 81–85.
- Victoir, K., Dujardin, J. C., de Doncker, S., Barker, D. C., Arevalo, J., Hamers, R., Le Ray, D. (1995). Plasticity of gp63 gene organization in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana*., *Parasitology.* England, **111** (Pt 3): 265–273.
- Vilas, F. (2017). Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: el papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid.
- Vilas, F., Carpintero, J., Sevilla, S., Martínez, A., Ordobás, M., Bernal, J., Díaz, R., Iriso, A., Sevillano, O., Escacena, C., De La Fuente, S., Arce, A., Estirado, A., Frutos, J., Fúster, F. (2012). Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. Medidas de investigación y control medioambiental, *Profesión Vet.*, (17): 6–15.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes, *Nucleic Acids Res.*, **31**(13): 3688–3691.
- Virgilio, M., Backeljau, T., Nevado, B., De Meyer, M. (2010). Comparative performances of DNA barcoding across insect orders., *BMC Bioinformatics*, **11**: 206.
- Volf, P., Hostomska, J., Rohousova, I. (2008). Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships., *Parasite.* France, **15**(3): 237–243.
- Volf, P., Myskova, J. (2007). Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors., *Trends Parasitol.* England, 91–92.

- Volf, P., Volfova, V. (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies., *J. Vector Ecol.* United States, **36 Suppl 1**: S1-9.
- Warburg, A., Schlein, Y. (1986). The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*., *Am. J. Trop. Med. Hyg.* United States, **35**(5): 926–930.
- Weigle, K., Labrada, L. A., Lozano, C., Santrich, C., Barker, D. C. (2002). PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*., *J. Clin. Microbiol.* United States, **40**(2): 601–606.
- Weigle, K., Saravia, N. G. (1996). Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis., *Clin. Dermatol.* United States, **14**(5): 433–450.
- Wickstead, B., Ersfeld, K., Gull, K. (2003). Repetitive elements in genomes of parasitic protozoa., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* United States, **67**(3): 360–75, table of contents.
- Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pages, M., Jauffret, Y., Dedet, J. P., Bastien, P. (1996). The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species., *Nucleic Acids Res.* England, **24**(9): 1688–1694.
- Woolhouse, M. E., Taylor, L. H., Haydon, D. T. (2001). Population biology of multihost pathogens., *Science.* United States, **292**(5519): 1109–1112.
- World Health Organization (2004). World health report 2004: changing history. Burden of disease in DALYs by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002, World Heal. Organ. Geneva. <http://www.who.int/whr/2004/en/>.
- World Health Organization (2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Technical report series, WHO (Edit.). Geneva, n°949.
- World Health Organization (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases, Second WHO Rep. neglected Trop. Dis.
- World Health Organization (2014). Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014–2020.
- World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean (WHO EMRO) (2008). Report on the intercountry meeting on leishmaniasis control strategies in the Eastern Mediterranean Region.
- Zackay, A., Nasereddin, A., Takele, Y., Tadesse, D., Hailu, W., Hurissa, Z., Yifru, S., Weldegebreal, T., Diro, E., Kassahun, A., Hailu, A., Jaffe, C. L. (2013). Polymorphism in the HASPB Repeat Region of East African *Leishmania donovani* Strains, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **7**(1): 1–10.
- Zahraei-ramazani, A., Kumar, D., Mirhendi, H., Sundar, S., Mishra, R., Moin-Vaziri, V., Soleimani, H., Shirzadi, M., Jafari, R., Hanafi-Bojd, A., Shahraky, S., Yaghoobi-Ershadil, M. (2015). Morphological and Genotypic Variations among the Species of the Subgenus *Adlerius* (Diptera: Psychodidae, *Phlebotomus*) in Iran, **9**(1): 84–97.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review., *Mol. Ecol.* England, **11**(1): 1–16.
- Zanger, P., Gabrysch, S. (2013). Leishmaniasis in the era of tumor necrosis factor alpha antagonist therapy—a research agenda for Europe., *Euro Surveill.* **18** (30): 20542.
- Zemanová, E., Jirků, M., Mauricio, I. L., Horák, A., Miles, M. A., Lukeš, J. (2007). The *Leishmania donovani* complex: Genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing, *Int. J. Parasitol.*, **37**(2): 149–160.
- Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., el-Hassan, I. M., el-Hassan, A. M. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis., *Lancet. Infect. Dis.* United States, **3**(2): 87–98.

VI. APÉNDICE

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de la distribución global de la leishmaniasis cutánea (A) y leishmaniasis visceral (B). Los puntos en azul representan los focos o brotes puntuales acontecidos en pequeñas comunidades (Adaptado de Pigott et al., 2014). - 12 -
- Figura 2.** Taxonomía basada en el análisis de MLEE del género *Leishmania*, conforme a la descripción realizada por Schönian et al., (2010). Los diferentes niveles taxonómicos están indicados en colores distintos. Varias especies (en negro) se agrupan en complejos de especies (azul), por lo que el complejo lleva el nombre de una de sus especies. Las especies están subrayadas según lo documentado en los estudios actuales. Los nombres de las especies que están entre paréntesis no son reconocidos por la mayoría de los autores como especies diferentes de la indicada en la parte superior; por ejemplo *L. chagasi* y *L. archibaldi* no se reconocen como especies, sino como sinónimos de *L. infantum* y *L. donovani* respectivamente. - 15 -
- Figura 3.** Morfología de las formas amastigote y promastigote de *L. infantum* en tinción con Giemsa y detalle de las estructuras intracelulares. (A): Amastigotes infectando macrófagos in vitro, forma intracelular, redondeada, de 2 a 6 µm. (B): Promastigotes en cultivo, forma extracelular, alargada, con flagelo anterior, de 7-15 µm de tamaño. - 16 -
- Figura 4.** Ciclo biológico de *Leishmania* spp. VL: leishmaniasis Visceral. CL: leishmaniasis cutánea. Adaptado de www.who.int/tdr - 18 -
- Figura 5.** Hembra adulta de *Phlebotomus* spp. - 19 -
- Figura 6.** Ciclo biológico de los flebótomos. Elaboración propia a partir de imágenes tomadas del portal www.grupoleishmania.org. - 21 -
- Figura 7.** Distribución de los flebótomos en España En verde se señalan las especies de flebótomos que coinciden en morfología con *P. perniciosus*; en rojo: especie dudosa de *P. ariasi* según las citas bibliográficas (Alcover, 2014). - 23 -
- Figura 8.** Representación esquemática de la distribución de LCan e infección por *Leishmania* en la población canina en un foco endémico. Imagen Adaptada de Baneth et al., (2008). - 27 -
- Figura 9.** Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis canina: (a) caquexia y lesiones faciales con dermatitis exfoliativa, (b) epistaxis, (c) onicogriposis, (d) alteraciones oculares: uveítis bilateral y opacidad de la córnea. Imágenes tomadas de Baneth et al., (2008) y Solano-Gallego et al., (2011). - 28 -
- Figura 10.** Reservorios alternativos de *L. infantum*. a) Gato: *Felis catus*, b) Lobo: *Canis Lupus*, c) Tejón: *Meles meles*, d) Zorro: *Vulpes vulpes*, e) Liebre: *Lepus granatensis* f) Canguro Ualabí: *Macropus rufus*. - 30 -
- Figura 11.** LC. Imágenes: WHO; Mateo et al., 2005. - 32 -

Figura 12. LMC. Imágen: WHO - 32 -

Figura 13. LCR. Imágen: WHO - 32 -

Figura 14. LV (*L. donovani*) en la India. Hepatoesplenomegalia evidente. Imágen: Murray *et al.*, 2005 - 33 -

Figura 15. LDPK con máculas hipopigmentadas. Imágen: WHO..... - 33 -

Figura 16. DPK con lesiones micropapulares. Imágen: Médicos Sin Fronteras..... - 33 -

Figura 17. Actual situación epidemiológica de la leishmaniasis en Europa. Distribución por áreas endémicas, zonas de extensión y países con casos autóctonos confirmados Adaptado de Dujardin *et al.*, 2008. - 36 -

Figura 18. Factores de riesgo relacionados con la (re-)emergencia de la leishmaniasis en Europa. - 38 -

Figura 19. Representación geográfica del número de casos de leishmaniasis registrados en el CMBD entre 2000-2011 en España por CCAA. Las CCAA que aparecen sombreadas son las que no han notificado casos de leishmaniasis como EDO a la RENAVE. Las CCAA que aparecen señaladas en rojo son aquellas en las que se alcanzaron incidencias superiores a la media del país (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012). - 40 -

Figura 20. Tendencia de los casos de leishmaniasis según los datos registrados en el CMBD (diagnóstico principal leishmaniasis). Comparación entre el número total de casos y el número de casos sin coinfección con VIH. España 1997-2011. Adaptado de Herrador *et al.*, (2015). - 41 -

Figura 21. Evolución temporal del número de casos de leishmaniasis en la CAM, 2001-2015 (actualizado a 25 de mayo de 2015), según fecha de inicio de los síntomas. Fuente: Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid. - 42 -

Figura 22. Localización y distribución de casos del brote de leishmaniasis humana de la zona suroeste de la CAM según residencia. Imagen adaptada de Aránguez-Ruiz *et al.*, (2014). - 43 -

Figura 23. Microfotografía electrónica del kDNA. La imagen muestra una sección longitudinal a través del extremo anterior del kinetoplasto, en el que el flagelo emerge de la bolsa flagelar. El kinetoplasto contiene el kDNA organizado en una red de moléculas de ADN circular, que forma una cola nucleoide en forma de disco compacto, visible en esta sección como una densa estructura con forma de barra. Imágenes adaptadas de Cell Image Library (<http://www.cellimagelibrary.org/images>). - 47 -

Figura 24. Esquema general de las técnicas comúnmente empleadas en el tipado molecular de Leishmania. Ejemplo de su uso en la discriminación entre dos especies A y B (Adaptado de Van der Auwera & Dujardin, 2015).	- 49 -
Figura 25. Aislados de <i>L. infantum</i> utilizados en esta Tesis Doctoral, en función del hospedador del que fueron obtenidos.	- 67 -
Figura 26. Características clínicas de los pacientes de los que se aislaron las cepas de <i>L. infantum</i> estudiadas. A la izquierda, las formas clínicas de la enfermedad. LC= Leishmaniasis cutánea; LV= Leishmaniasis visceral; LG: Leishmaniasis ganglionar o linfadenopatía; LMC= Leishmaniasis mucocutánea. A la derecha se representa el número de casos respecto a la infección por VIH.	- 69 -
Figura 27. Trampa de luz CDC.	- 74 -
Figura 28. Principales características diferenciales entre flebótomos hembras y machos.	- 75 -
Figura 29. Esquema de extracción de ADN usando el Kit QIAmp® DNA mini Kit de QIAGEN.....	- 76 -
Figura 30. Representación del operón ribosomal indicando las regiones ITS1 e ITS2 y los oligonucleótidos empleados para la amplificación y caracterización molecular de las cepas de <i>L. infantum</i>	- 80 -
Figura 31. Organización de los péptidos que componen la región que codifica para el antígeno k26. El dominio central repetitivo dispuesto en tándem y compuesto por 14 aminoácidos representado como cuadros de color verde y un recuadro en blanco de líneas punteadas que representa el número de repeticiones variables que se pueden encontrar según el polimorfismo de esta diana. En líneas amarillas los oligonucleótidos de PCR (K26F y K26R) para lograr amplificar el fragmento. En la parte inferior derecha de la imagen se representa la composición de la secuencia del péptido A03, como ejemplo.	- 83 -
Figura 32. Marcador de peso molecular.	- 89 -
Figura 33. Alineamiento parcial de los ocho tipos de secuencias ITS descritas por Kuhls <i>et al.</i> (2005) para las cepas del complejo <i>Leishmania donovani</i> y del tipo de secuencia ITS LOMBARDI, identificada en 52 aislados de <i>L. infantum</i> en Madrid, 2008-2012.....	- 107 -
Figura 34. Se presenta el árbol más parsimonioso encontrado por búsqueda heurística, e inferido mediante el análisis de parsimonia de las secuencias de nucleótidos de ITS1 e ITS2. Los números por encima de las ramas indican (en porcentaje) el valor de <i>bootstrap</i> que apoya una rama determinada en 10.000 réplicas.....	- 108 -
Figura 35. Distribución de los genotipos combinados en el análisis de los aislados de <i>L. infantum</i> procedentes de Madrid, España, desde el 1 de enero de 2008 al 31 Julio de 2012 (Grupo 1). Los números 1-11 representan las 11 Áreas de Salud en Madrid.	- 110 -

Figura 36. Distribución de los tipos de secuencias ITS para cada zimodema los aislados de *L. infantum* procedentes de Madrid, España, 1988-2005 (Grupo 2, n=83). Los números 1-11 representan las 11 Áreas de Salud en Madrid..... - 111 -

Figura 37. Alineamiento parcial de las secuencias ITS2. Solo se muestran las tres posiciones diferentes respecto a las secuencias que aparecen en España (ITS-A, ITS-B e ITS-LOMBARDI). En rojo se señalan los polimorfismos en los microsatélites destacados para la secuencia ITS-LISA. - 123 -

Figura 38. Distribución geográfica de los genotipos ITS de *L. infantum* procedentes de aislados clínicos de casos humanos seleccionados por Comunidades Autónomas (n = 475). Los gráficos individuales indican la proporción de las cepas en cada región incluida en el análisis. Las abreviaturas para las Comunidades Autónomas son las siguientes: GAL: Galicia, CL: Castilla y León, EXT: Extremadura, C-LM: Castilla La Mancha, AND: Andalucía, BAL: Islas Baleares. - 124 -

Figura 39. Diversidad y frecuencia de los genotipos ITS de *L. infantum* en aislados procedentes de casos humanos, de perros y flebotomos en España, 1986-2015. - 125 -

Figura 40. Análisis filogenético de *L. infantum* basado en las secuencias de nucleótidos de las regiones ITS1 e ITS2 de los diferentes tipos de ITS descritos en el complejo *L. donovani* (Kuhls *et al.*, 2005). La variación de secuencia se basa únicamente en polimorfismos de microsatélites. Se presenta un árbol esquemático inferido por análisis de Máxima Parsimonia. El cladograma es el árbol más parsimonioso encontrado por la búsqueda heurística, los números por encima de las ramas indican los porcentajes con los que una rama está soportada en 10.000 réplicas de bootstrap. - 126 -

Figura 41. Secuencias tipo K26 (ST) identificadas en aislados clínicos españoles de *L. infantum* STs-k26 durante el período 1986-2013, representado como número de cepas por año. Sólo se muestran los ocho ST más abundantes que aparecen más de un año. - 128 -

Figura 42. Asociación de los genotipos ITS-A e ITS-LOMBARDI a los ciclos de transmisión de *L. infantum* en el área urbana del Suroeste de Madrid..... - 137 -

Figura 43. Países y regiones de España de procedencia de las cepas de *L. infantum* incluidas en el análisis. En verde: países/regiones de los que se incluyen 3 cepas o menos; en amarillo: países/regiones de los que se incluyen más de 3 cepas..... - 143 -

Figura 44. Árbol filogenético obtenido mediante *Neighbor-joinig* inferido a partir de las distancias genéticas entre las 175 secuencias tipo encontrados en *L. infantum*. Se observan cuatro agrupaciones representadas por un grupo de 72 LSTs en la población POP-A (rojo), 30 LSTs en POP-B (verde), 61 LSTs en POP-C (azul) y 12 LSTs en POP-D (amarillo). A la derecha se indican las poblaciones (K) obtenidas con *STRUCTURE*..... - 157 -

Figura 45. Estructura de poblaciones de las 385 cepas de *L. infantum* analizadas, como se deduce por el software de *STRUCTURE*. La estructura se basa en los datos de los perfiles alélicos encontrados por el análisis de los 7 marcadores multilocus (MLSA). (A) Representa la estimación del valor de K. El pico principal en K=4, indica el número más probable de poblaciones en el conjunto de cepas totales. (B) Segmentos verticales (*barplots*) donde K =

4 es el número de poblaciones asumidas. Cada color representa una población, y la longitud del segmento coloreado muestra la proporción estimada de miembros de esa población. En cada población se indican los países en donde están presentes estas poblaciones. Los gráficos circulares incluidos en cada población representan el porcentaje de cepas en función del origen geográfico (ES: España vs. Otros países). Además, se incluye un gráfico circular para representar el porcentaje de cepas MON-1 y No-MON-1 (38 zimodemas diferentes) y otro para el tipo de hospedador (LHum, leishmaniasis humana; LCan, leishmaniasis canina, LFleb: cepas de *Leishmania* obtenidas del flebótomo). - 158 -

Figura 46. Sitios de muestreo geocodificados y número de flebótomos capturados de acuerdo a la zona bioclimática de España. Los números indican los lugares de muestreo: Agés (Burgos) (1), Escarabajosa de Cabezas (Segovia) (2), Zaorejas (Guadalajara) (3), Majadahonda (Madrid) (4), Vicálvaro (Madrid) (5), Cañamero (Cáceres) (6), Buenache de Alarcón (Cuenca) (7), Castilblanco de los Arroyos (Sevilla) (8), Archivel (Murcia) (9), Moratalla (Murcia) (10), and San Joan de Labritja (Ibiza) (11). Los círculos de colores indican las especies de flebótomos. El tamaño del círculo indica el número de ejemplares acorde a la escala que se muestra en la gráfica. 170

Figura 47. Perfiles *Ase* I RFLP de los productos de *cytb-nd1* PCR en las secuencias seleccionadas y representativas de cada una de las especies colectadas en España (Panel 1). Marcador de peso molecular de 100 pb (Línea M), *P. perniciosus*-variante 1 (Línea 1), *P. perniciosus*-variante 2 (Línea 2), *P. ariasi*-variante 1 (Línea 3), *P. papatasi* (Línea 4) y *S. minuta* (Línea 5). a. Experimento en el laboratorio de *Ase* I RFLP y b. Análisis “in-silico” *Ase* I RFLP de los mismos especímenes analizados en la figura a usando el software NEBcutter V2.0. - 175 -

Figura 48. Análisis “in silico” de *Ase* I RFLP utilizando la herramienta NEBcutter V2.0. Se exponen los patrones de RFLP que son similares o casi indistinguibles entre sí. Los patrones se indican en números romanos en la parte inferior de la imagen. La carrera virtual muestra los productos digeridos en un gel de agarosa al 2% del valor teórico y la resolución completa de un marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 1: *P. longicuspis*_1; Carril 2: *P. perfiliewi*; Carril 3: *P. perniciosus*_2; Carril 4: *P. ariasi*_1; Carril 5: *P. chabaudi*_1; Carril 6: *P. riouxi*; Carril 7: *P. balcanicus*; Carril 8: *P. neglectus*; Carril 9: *P. sergenti*_1; Carril 10: *P. caucasicus*_1; Carril 11: *P. chadlii*. - 177 -

Figura 49. Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleotídicas de la región parcial del gen *cytb-nd1* a partir de muestras representativas para cada una de las especies de flebótomo estudiados en este trabajo (*P. perniciosus*, *P. longicuspis*, *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. chabaudi*, *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. riouxi*, *P. sergenti*, *P. chadlii*, *P. balcanicus* y *S. minuta*). Los genes correspondientes se indican en la parte superior del alineamiento. Los números en la parte inferior indican las posiciones de nucleótidos. Números al final de cada línea indican la longitud en pb de cada secuencia. 178

Figura 50. Análisis virtual (“in silico”) producido con NEBcutter V2.0 que muestra los dieciséis patrones de RFLP obtenidos a partir de las secuencias de ADN *cytb-nd1* de los paneles-1 y -2. Los patrones se indican en números romanos. La carrera virtual muestra los productos digeridos en una electroforesis en gel de agarosa al 2% de valor teórico y la resolución completa de un marcador de peso molecular de 100 pb. L=70mm. De izquierda a derecha se indican los patrones: Patrón I: *P. perniciosus*_1, *P. longicuspis*_2; Patrón II: *P. perniciosus*_2; Patrón III: *P. longicuspis*_1; Patrón IV: *P. ariasi*_1; Patrón V: *P. ariasi*_2; Patrón VI: *P. papatasi*; Patrón VII: *P. riouxi*, *P. balcanicus*, *P. chabaudi*_1; Patrón VIII: *P. chabaudi*_2; Patrón IX: *P. neglectus*; Patrón X: *P. perfiliewi*; Patrón XI: *P. sergenti*_1, *P.*

caucasicus_1; Patrón XII: *P. sergenti_2*; Patrón XIII: *P. chadlii*; Patrón XIV: *P. caucasicus_2*; Patrón XV: *S. minuta_1*; Patrón XVI: *S. minuta_2*..... 180

Figura 51. Resumen gráfico del procesamiento del material entomológico. a) Disección de cabeza y último segmento distal del abdomen (genitalia) y b) montaje en portaobjetos para observación bajo microscopio e identificación morfológica. c) eliminación del etanol de los fragmentos del flebótomo almacenados (restos de abdomen, alas, y patas) d) extracción de ADN para la posterior identificación molecular..... - 191 -

Figura 52. Orden que exhibe el ADN mitocondrial de los insectos. Los genes codificados en la cadena α (orientación hacia la derecha) se señalan en color verde (claro y oscuro). Los genes codificados en la cadena β (orientación hacia la izquierda) son de color rojo o naranja. Los nombres de genes son las abreviaturas estándar que se utilizan en este documento; las regiones candidatas en este estudio a códigos de barras se indican en color negro con los correspondientes oligonucleótidos a utilizar para su amplificación mediante PCR. Adaptado de Negrísolo *et al.*, (2011). - 192 -

Figura 53. Geolocalización de las secuencias de la Colección 2. En color rosa, los países que correspondientes a las secuencias disponibles del gen *cytb*; en azul los correspondientes a las secuencias disponibles del *coi*. En líneas combinadas, países de los que se dispone de los dos tipos de secuencia. - 197 -

Figura 54. Árbol consenso obtenido del análisis de secuencias del gen *coi* de 15 especies diferentes (119 haplotipos), según el método de Máxima Verosimilitud (aBayes), modelo GTR+I+G y 2000 réplicas de *bootstrap*. Los valores mostrados representan el porcentaje de soporte de cada uno de los grupos. Los colores indican los grupos o especies incluidos en el análisis. El país/región de origen para cada grupo de individuos está indicado fuera del árbol. - 214 -

Figura 55. Árbol consenso obtenido del análisis de secuencias del gen *coi* de 15 especies diferentes (119 haplotipos), según el método de *Neighbor Joining*, modelo K2P y 2000 réplicas de *bootstrap*. Los valores mostrados representan el porcentaje de soporte de cada uno de los grupos. Los colores indican los grupos o especies incluidos en el análisis. El país/región de origen para cada grupo de individuos está indicado fuera del árbol..... - 215 -

Figura 56. Árbol consenso obtenido del análisis de secuencias del fragmento del gen *cytb* de 18 especies de flebótomos diferentes (175 haplotipos), según el método de Máxima Verosimilitud (aBayes), modelo GTR+I+G y 2000 réplicas de *bootstrap*. Los valores mostrados representan el porcentaje de soporte de cada uno de los grupos. Los colores indican los grupos o especies incluidos en el análisis. El país/región de origen para cada grupo de individuos está indicado fuera del árbol. - 216 -

Figura 57. Árbol consenso obtenido del análisis de secuencias del fragmento del gen *cytb* de 18 especies de flebótomos diferentes (175 haplotipos), según el método de *Neighbor Joining*, modelo K2P y 2000 réplicas de *bootstrap*. Los valores mostrados representan el porcentaje de soporte de cada uno de los grupos. Los colores indican los grupos o especies incluidos en el análisis. El país/región de origen para cada grupo de individuos está indicado fuera del árbol..... - 217 -

Figura 58. Estrategia experimental para la generación de códigos de barras de ADN y la identificación molecular de flebótomos..... - 218 -

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Posición taxonómica de <i>Leishmania infantum</i> (Cavalier-Smith, 1998).....	- 13 -
Tabla 2. Clasificación taxonómica de los flebótomos.	- 19 -
Tabla 3. Especies de flebótomos vectores, probados o sospechosos*, de <i>L. infantum</i> , <i>L. tropica</i> y <i>L. major</i> en la cuenca mediterránea y regiones aledañas (basado en Alcover, 2014; Maroli et al., 2013; Ready, 2010).	- 24 -
Tabla 4. Detección de <i>Leishmania</i> , presumiblemente <i>L. infantum</i> , en animales silvestres.	- 29 -
Tabla 5. Detalle de las principales especies de <i>Leishmania</i> de interés médico y las principales manifestaciones clínicas a las que se asocian. No se consideran las manifestaciones clínicas en sujetos co-infectados con el VIH (Tomada de Llanes-Acevedo et al., 2016).	- 31 -
Tabla 6. Contribución de las herramientas de biología molecular al conocimiento de cada uno de los actores relacionados con el ciclo de transmisión de <i>Leishmania</i>	- 54 -
Tabla 7. Distribución de los aislados de <i>L. infantum</i> según el hospedador y su origen geográfico.	- 68 -
Tabla 8. Características de la población de la cual se obtuvieron los aislados clínicos del parásito (n=475).	- 69 -
Tabla 9. Zimodemas de 344 de los aislados de <i>L. infantum</i> incluidos en este estudio.	- 70 -
Tabla 10. Características de los pisos mediterráneos en la Península Ibérica e Islas Baleares y número ejemplares muestreados.	- 74 -
Tabla 11. Componentes de las reacciones anidadas de PCR-ITS1.....	- 79 -
Tabla 12. Programa de amplificación de las reacciones de PCR ITS-1.....	- 80 -
Tabla 13. Componentes para las reacciones de PCR de las regiones ITS1 e ITS2.....	- 81 -
Tabla 14. Programa de amplificación de las regiones ITS1 e ITS2. En ambas dianas moleculares se utiliza el mismo programa de amplificación.	- 81 -
Tabla 15. Componentes para la reacción de K26-PCR.....	- 82 -
Tabla 16. Condiciones de amplificación de la región que codifica para K26.....	- 82 -
Tabla 17. Componentes de la reacción de PCR de los genes multilocus de <i>L. infantum</i>	- 84 -
Tabla 18. Secuencias de oligonucleótidos empleados en la amplificación de los fragmentos de los 7 genes que componen el sistema MLSA.	- 85 -
Tabla 19. Condiciones de amplificación de los siete genes multilocus a partir del ADN de <i>L. infantum</i>	- 85 -
Tabla 20. Componentes de la reacción de PCR para el gen mitocondrial <i>coi</i>	- 86 -

Tabla 21. Condiciones de amplificación de la PCR del gen mitocondrial <i>coi</i>	- 86 -
Tabla 22. Componentes de la reacción de PCR para el gen mitocondrial <i>cytb</i>	- 87 -
Tabla 23. Condiciones de amplificación de la PCR del gen mitocondrial <i>cytb</i>	- 87 -
Tabla 24. Componentes del tratamiento de digestión del ADN del <i>Cytb</i> con <i>Ase I</i>	- 88 -
Tabla 25. Características del microchip de ADN1000 utilizado para la electroforesis capilar.	- 90 -
Tabla 26. Herramientas empleadas en los análisis bioinformáticos realizados en esta Tesis Doctoral.....	- 94 -
Tabla 27. Detalles de la distribución por año, Área de Salud, y forma clínica de los casos de leishmaniasis procedentes de Madrid diagnosticados mediante PCR en el OMS-CCL, 1 de enero de 2008 a 31 de Julio de 2012 (n=475).....	- 98 -
Tabla 28. Tipado molecular de los aislados de <i>L. infantum</i> incluidos en el Grupo 1. Madrid, 1 enero de 2008 a 31 julio de 2012 (Grupo 1, n=73).....	- 100 -
Tabla 29. Listado de las cepas de <i>L. infantum</i> MON-1 y MON-24 incluidas en el Grupo 2, Madrid, España, 1988-2005 (Grupo 2, n=83).....	- 102 -
Tabla 30. Principales características de los 550 aislados de <i>L. infantum</i> usados en este estudio, se muestran también los genotipos ITS y K26.	120
Tabla 31. Secuencia de los aminoácidos que componen los péptidos de la proteína antigénica K26 (HASPb) en <i>L. infantum</i>	- 129 -
Tabla 32. Organización de la secuencia peptídica que compone el dominio central repetitivo de K26 en <i>L. infantum</i> . La secuenciación se realizó en 215 cepas (Anexo 1). Se presentan los grupos únicos por ST-K26 (1-8) derivado del tamaño del amplicón K26. La composición de cada uno de los 8 péptidos que componen la estructura (indicado con la letra A, numerada 00, 03, 09, 10, 16, 17, 18, 19) se muestran en la tabla 32. La posición y número de los péptidos en cada una de las ST varía de longitud (9 a 19 péptidos). Los péptidos conservados (parte inicial, central y terminal de la cadena) se señalan en negrita.	130
Tabla 33. Variabilidad genética a nivel de zimodemas, mediante el genotipo ITS	- 131 -
Tabla 34. Variabilidad genética de <i>L. infantum</i> en la STs-K26 a nivel de zimodemas y su asociación con las secuencias tipo ITS.....	- 132 -
Tabla 35. Variabilidad genética de <i>L. infantum</i> en la STs-K26 y su asociación con las secuencias tipo ITS.....	- 133 -
Tabla 36. Parámetros de diversidad genética de los loci estudiados en las 385 cepas incluidas en el presente estudio.	- 149 -
Tabla 37. Variabilidad alélica por locus estudiado.....	- 150 -
Tabla 38. Perfiles alélicos obtenidos en las cepas de <i>L. infantum</i> analizadas. La tabla incluye una cepa por genotipo LST.....	- 153 -

Tabla 39. Resumen de las características más destacadas por tipo de población de <i>L. infantum</i> , genotipos MLSA, distribución geográfica, perfil isoenzimático y hospedador.....	160 -
Tabla 40. Descripción de los sitios de muestreo, especies, y número de especímenes incluidos en el Panel 1 (N=155). Flebótomos capturados en España, entre junio y octubre de 2013.....	171
Tabla 41. Descripción de los países de muestreo, especies y número de especímenes incluidos en el Panel 2 (N = 277), para los cuales se obtuvo la secuencia de la región <i>cytb-nd1</i> del GenBank.	174 -
Tabla 42. Resumen de los patrones obtenidos por <i>Ase</i> I RFLP en las 432 secuencias de ADN consideradas en este estudio. Se incluye información relativa a las especies de flebótomos, número de especímenes, tamaño previsto de los productos digeridos y longitud de las secuencias.....	181
Tabla 43. Relación de las secuencias del Conjunto 1 (n=155). Número de especímenes, origen y códigos de acceso de la colección de flebótomos para este estudio.	195
Tabla 44. Características de las 288 secuencias incluidas en el estudio del gen <i>coi</i> . Se describen haplotipos por especie (h), número de sitios polimórficos (S), número de polimorfismos de nucleótido único (SNP), número de sitios informativos de parsimonia (SIP), número total de mutaciones (Eta).....	198 -
Tabla 45. Origen geográfico, haplotipos <i>coi</i> e información de acceso de las 133 secuencias del gen <i>coi</i> de las 15 especies de flebótomos obtenidas del Genbank.	200 -
Tabla 46. Distancias genéticas en el gen <i>coi</i> en 15 especies diferentes de los subgéneros <i>Phlebotomus</i> y <i>Sergetomyia</i> siguiendo el modelo K2P. Nótese los valores de divergencia más altos y más bajos indicados en negrita.....	202 -
Tabla 47. Características de las 491 secuencias incluidas en el estudio del gen <i>cytb</i> . Se describen número de secuencias y haplotipos por especie (h), seguido del número de sitios polimórficos (S), número de polimorfismos de un único nucleótido (SNP), número de sitios informativos de parsimonia (SIP), número total de mutaciones (Eta).	204 -
Tabla 48. Origen geográfico, haplotipos <i>cytb</i> e información de acceso de las 336 secuencias de 18 especies de flebótomos obtenidas del Genbank.	205 -
Tabla 49. Distancias genéticas en las secuencias del <i>cytb</i> . Los análisis se llevaron a cabo utilizando el modelo K2P. El análisis involucró 175 secuencias de nucleótidos. Nótese los valores de divergencia más altos y más bajos indicados en negrita cotejados con las demás especies.....	210
Tabla 50. Comparativa de algunas de las variables determinadas en los genes <i>coi</i> (288 secuencias) y <i>cytb</i> (491 secuencias) en las 20 especies de flebótomos analizados.....	211
Tabla 51. Comparativa de los tiempos de ejecución de los programas empleados en el análisis de código de barras de ADN.....	212 -

VII. ANEXOS

Anexo 1. Información clínico epidemiológicos de tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* obtenidos a partir de casos humanos utilizados en este estudio (n=475).

Código Lab	Código OMS	Año	Origen	Cepa	Forma	VIH	Edad	Sexo	Zimodema	Tipo ITS	ST-K26	Subgrupo K26	Capítulo
IK-1	MHOM/ES/1999/LLM-906	1999	Cataluña	E514-B	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	920/626	n.d	2, 3
IK-2	MHOM/ES/1999/LLM-900	1999	Andalucía	E388-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-3	MHOM/ES/1999/LLM-896	1999	C. Madrid	Pedreño-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-4	MHOM/ES/1999/LLM-885	1999	Cataluña	E484-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	920	n.d	2, 3
IK-5	MHOM/ES/1999/LLM-883	1999	C. Madrid	Vega-P	LC	POS	42	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-6	MHOM/ES/1999/LLM-878	1999	Cataluña	E493-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-7	MHOM/ES/1999/LLM-860	1999	Cataluña	E421-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	542	542	2, 3
IK-8	MHOM/ES/1999/LLM-853	1999	Cataluña	E1075-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-9	MHOM/ES/1999/LLM-851	1999	Castilla- LM	Reinoso-M	LV	POS	41	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-10	MHOM/ES/1999/LLM-829	1999	I. Baleares	IPBB-P	LC	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-11	MHOM/ES/1999/LLM-826	1999	C. Madrid	E378-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-12	MHOM/ES/1999/LLM-821	1999	I. Baleares	E360-B	LV	POS	>18	M	MON-1	A	626/584	626 b/584 b	2, 3
IK-13	MHOM/ES/1999/LLM-823	1999	Valencia	E315-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-14	MHOM/ES/1998/LLM-818	1998	Cataluña	E344-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-15	MHOM/ES/1998/LLM-817	1998	I. Baleares	Loeches-M	LV	POS	>18	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-16	MHOM/ES/1998/LLM-789	1998	C. Madrid	Vanessa-M	LV	NEG	23	F	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-17	MHOM/ES/1998/LLM-773	1998	Valencia	E252-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626a	2
IK-18	MHOM/ES/1998/LLM-766	1998	Cataluña	E241-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2
IK-19	MHOM/ES/1998/LLM-757	1998	Valencia	E204-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2
IK-20	MHOM/ES/1998/LLM-755	1998	C. Madrid	E255-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	1, 2
IK-21	MHOM/ES/1998/LLM-745	1998	Andalucía	E183-B	LV	POS	30	n.d	MON-1	A	920	920 j	2
IK-22	MHOM/ES/1998/LLM-744	1998	I. Baleares	E215-B	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626/584	626 b/584 b	2
IK-23	MHOM/ES/1998/LLM-739	1998	C. Madrid	Trillo-M	LV	POS	29	M	MON-1	A	626	626b	1, 2
IK-24	MHOM/ES/1998/LLM-732	1998	Cataluña	E100-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2
IK-25	MHOM/ES/1998/LLM-725	1998	I. Baleares	E108-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2
IK-26	MHOM/ES/1997/LLM-720	1997	I. Baleares	E106-M	LV	POS	>18	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-27	MHOM/ES/1997/LLM-616	1997	C. Madrid	Lucas-LA	LV	POS	35	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-28	MHOM/ES/1997/LLM-698	1997	I. Baleares	Paco	LV	POS	32	M	MON-1	A	626	626a	2
IK-29	MHOM/ES/1997/LLM-695	1997	I. Baleares	Bartolo	LC	NEG	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-30	MHOM/ES/1997/LLM-693	1997	Cataluña	E56-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2
IK-31	MHOM/ES/1997/LLM-692	1997	I. Baleares	E50-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626/584	626 a/584 b	2
IK-32	MHOM/ES/1997/LLM-690	1997	C. Madrid	E79-B	LV	POS	>18	n.d	MON-1	LOMBARDI	920	920 b	1, 2, 3
IK-33	MHOM/ES/1997/LLM-682	1997	I. Baleares	Casanov-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-34	MHOM/ES/1997/LLM-675	1997	I. Baleares	Abraham-S	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626/584	626 b/584 b	2
IK-35	MHOM/ES/1997/LLM-674	1997	C. Madrid	Jurado-B	LV	POS	33	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-36	MHOM/ES/1997/LLM-465	1997	C. Madrid	Fraille-M	LV	POS	35	M	MON-1	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-37	MHOM/ES/1997/LLM-666	1997	C. Madrid	Robert-P	LC	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-38	MHOM/ES/1997/LLM-665	1997	C. Madrid	Maxi-M	LV	POS	45	M	MON-1	A	626	626a	1, 2, 3
IK-39	MHOM/ES/1997/LLM-623	1997	C. Madrid	Pilar-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-40	MHOM/ES/1997/LLM-620	1997	Valencia	Pemán	LV	NEG	2	n.d	MON-1	A	626	626b	2
IK-41	MHOM/ES/1997/LLM-607	1997	C. Madrid	Pons-P	LC	POS	60	M	MON-1	A	878	878a	1, 2, 3
IK-42	MHOM/ES/1997/LLM-606	1997	I. Baleares	Adrian-P	LC	NEG	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-43	MHOM/ES/1996/LLM-548	1996	C. Madrid	Cámara	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-44	MHOM/ES/1996/LLM-553	1996	C. Madrid	Toro-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-45	MHOM/ES/1996/LLM-578	1996	I. Baleares	Gari-M	LV	POS	36	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-46	MHOM/ES/1996/LLM-527	1996	I. Baleares	Amador-M	LV	POS	34	M	MON-1	A	836	836 b	2, 3
IK-47	MHOM/ES/1996/LLM-556	1996	C. Madrid	JR-M	LV	POS	25	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-48	MHOM/ES/1996/LLM-554	1996	C. Madrid	Miguel-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-49	MHOM/ES/1996/LLM-551	1996	C. Madrid	Pati-M	LV	NEG	2	F	MON-1	A	N.A	n.d	2, 3
IK-50	MHOM/ES/1996/LLM-549	1996	C. Madrid	Hidalgo-M	LV	POS	29	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-51	MHOM/ES/1995/LLM-535	1995	I. Baleares	López-M	LV	POS	27	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-52	MHOM/ES/1995/LLM-523	1995	Valencia	Mañogil-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626a	2, 3
IK-53	MHOM/ES/1995/LLM-486	1995	Andalucía	Holgado	LV	POS	40	M	MON-1	A	920	920 b	2
IK-54	MHOM/ES/1995/LLM-484	1995	Castilla/León	Balsa-M	LV	n.d	68	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-55	MHOM/ES/1995/LLM-482	1995	C. Madrid	Silva-M	LV	NEG	62	M	MON-1	A	626	626b	1, 2
IK-56	MHOM/ES/1995/LLM-478	1995	C. Madrid	Rami-B	LV	POS	34	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-57	MHOM/ES/1995/LLM-470	1995	C. Madrid	Leonor-M2	LV	POS	32	F	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-58	MHOM/ES/1995/LLM-468	1995	C. Madrid	David-S	LV	n.d	n.d	M	MON-1	A	626	626a	1, 2, 3
IK-59	MHOM/ES/1995/LLM-466	1995	Cataluña	Grau-M	LV	NEG	1	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-60	MHOM/ES/1995/LLM-464	1995	C. Madrid	Rey-M2	LV	POS	35	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-61	MHOM/ES/1995/LLM-452	1995	Castilla/León	Bierzo-M	LV	NEG	20	n.d	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-62	MHOM/ES/1994/LLM-410	1994	C. Madrid	Rayo-M	LV	POS	31	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-63	MHOM/ES/1992/LLM-335	1992	C. Madrid	Espin-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	LOMBARDI	920	920 b	1, 2, 3
IK-64	MHOM/ES/1992/LLM-323	1992	C. Madrid	Manu-B	LV	POS	31	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-65	MHOM/ES/1992/LLM-320	1992	I. Baleares	Carrasco-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-66	MHOM/ES/1992/LLM-315	1992	C. Madrid	Armenter-M	LV	n.d	n.d	M	MON-1	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3

Anexo 1 (continuación). Información clínico epidemiológicos de tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* obtenidos a partir de casos humanos utilizados en este estudio (n=475).

Código Lab	Código OMS	Año	Origen	Cepa	Forma	VIH	Edad	Sexo	Zimodema	Tipo ITS	ST-K26	Subgrupo K26	Capítulo
IK-67	MHOM/ES/1992/LLM-306	1992	C. Madrid	Esteso-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-68	MHOM/ES/1991/LLM-328	1991	C. Madrid	Elena-M	LV	NEG	n.d	M	MON-1	A	626	626a	1, 2, 3
IK-69	MHOM/ES/1991/LLM-326	1991	C. Madrid	Tomas-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-70	MHOM/ES/1988/LLM-190	1988	Castilla- LM	Jesús-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-71	MHOM/ES/1988/LLM-180	1988	C. Madrid	Milagros	LV	NEG	67	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-72	MHOM/ES/2003/LLM-277	2003	I. Baleares	Magda-M	LV	n.d	n.d	F	MON-1	A	626	626b	2
IK-73	MHOM/ES/1987/LLM-150	1987	Castilla- LM	Antonio	LV	POS	32	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-74	MHOM/ES/2005/LLM-1523	2005	C. Madrid	Mica-M	LV	n.d	>18	M	MON-1	A	626	626a	1, 2, 3
IK-75	MHOM/ES/2005/LLM-1524	2005	C. Madrid	Escu-M	LV	n.d	>18	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-76	MHOM/ES/2005/LLM-1492	2005	C. Madrid	Rayo-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626a	1, 2, 3
IK-77	MHOM/ES/2005/LLM-1476	2005	Cataluña	Esteve-M	LV	NEG	2	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-78	MHOM/ES/2004/LLM-1461	2004	C. Madrid	Pefe-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-79	MHOM/ES/2004/LLM-1408	2004	I. Baleares	Muro-M	LV	n.d	n.d	F	MON-1	A	626	626b	2
IK-80	MHOM/ES/2004/LLM-1406	2004	I. Baleares	Gelse-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-81	MHOM/ES/2004/LLM-1405	2004	C. Madrid	Rejón-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-82	MHOM/ES/2004/LLM-1404	2004	I. Baleares	Here-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-83	MHOM/ES/2004/LLM-1377	2004	C. Madrid	Peru-M	LV	POS	>18	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-84	MHOM/ES/2004/LLM-1372	2004	C. Madrid	Lumi-M	LV	POS	>18	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-85	MHOM/ES/2004/LLM-1370	2004	I. Baleares	Samu-S	LV	NEG	<1	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-86	MHOM/ES/2004/LLM-1366	2004	Cataluña	Eno-M	LV	NEG	<1	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-87	MHOM/ES/2004/LLM-1362	2004	I. Baleares	Cañe-M	LV	n.d	n.d	M	MON-1	A	920	n.d	2
IK-88	MHOM/ES/2004/LLM-1361	2004	Valencia	Lisa-P	LC	NEG	n.d	F	MON-1	LISA	1100/962	n.d	2
IK-89	MHOM/ES/2004/LLM-1358	2004	Cataluña	Bonet-M	LV	NEG	<1	F	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-90	MHOM/ES/2004/LLM-1349	2004	I. Baleares	Ramiro-M	LV	NEG	3	M	MON-1	A	626	626a	2
IK-91	MHOM/ES/2004/LLM-1347	2004	C. Madrid	Quiros-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-92	MHOM/ES/2004/LLM-1337	2004	C. Madrid	Gomez-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-93	MHOM/ES/2003/LLM-1327	2003	C. Madrid	Oprinca-M	LV	NEG	1	F	MON-1	A	626	626a	1, 2, 3
IK-94	MHOM/ES/2003/LLM-1310	2003	I. Baleares	Silvia-M	LV	POS	n.d	F	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-95	MHOM/ES/2003/LLM-1309	2003	I. Baleares	Jero-M	LV	NEG	<1	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-96	MHOM/ES/2003/LLM-1304	2003	C. Madrid	Adam-M	LV	NEG	>18	M	MON-1	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-97	MHOM/ES/2003/LLM-1262	2003	C. Madrid	Fresne-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-98	MHOM/ES/2003/LLM-1261	2003	Extremadura	Sousa-B	LV	NEG	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-99	MHOM/ES/2003/LLM-1258	2003	C. Madrid	Pagar-M	LV	NEG	59	M	MON-1	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-100	MHOM/ES/2003/LLM-1253	2003	Cataluña	Rasa-M	LV	NEG	1	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-101	MHOM/ES/2003/LLM-1236	2003	Valencia	Serrano-S	LV	NEG	3	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-102	MHOM/ES/2003/LLM-1231	2003	Valencia	Casas-M	LV	POS	37	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-103	MHOM/ES/2002/LLM-1220	2002	C. Madrid	Sasa-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	584	584 a	1, 2, 3
IK-104	MHOM/ES/2002/LLM-1189	2002	I. Baleares	47314-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	920	920 j	2, 3
IK-105	MHOM/ES/2002/LLM-1181	2002	C. Madrid	Ruij-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-106	MHOM/ES/2002/LLM-1166	2002	C. Madrid	García-M	LV	POS	40	M	MON-1	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-107	MHOM/ES/2002/LLM-1163	2002	Andalucía	Horcas-M	LV	POS	26	M	MON-1	A	878	878b	2, 3
IK-108	MHOM/ES/2002/LLM-1150	2002	I. Baleares	Sebas-P	LC	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2
IK-109	MHOM/ES/2002/LLM-1134	2002	I. Baleares	PAAF	LV	n.d	n.d	M	MON-1	A	626	626a	2
IK-110	MHOM/ES/2001/LLM-984	2001	C. Madrid	Riaza-M	LV	NEG	56	M	MON-1	LOMBARDI	920	920 j	1, 2, 3
IK-111	MHOM/ES/2001/LLM-983	2001	C. Madrid	Motos-M	LV	POS	37	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-112	MHOM/ES/2001/LLM-980	2001	C. Madrid	Sanchez-G	LV	NEG	28	M	MON-1	LOMBARDI	962	962 d	1, 2, 3
IK-113	MHOM/ES/2001/LLM-1093	2001	Andalucía	Merino-M	LV	POS	39	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-114	MHOM/ES/2001/LLM-1049	2001	I. Baleares	Homen-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-115	MHOM/ES/2001/LLM-1048	2001	I. Baleares	Horarch-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-116	MHOM/ES/2000/LLM-964	2000	Cataluña	Catalá-M	LV	POS	38	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-117	MHOM/ES/2000/LLM-962	2000	Cataluña	E568-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2
IK-118	MHOM/ES/2000/LLM-960	2000	Cataluña	Penedés-B	LV	POS	31	M	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-119	MHOM/ES/2000/LLM-943	2000	Andalucía	E415-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2
IK-120	MHOM/ES/2000/LLM-936	2000	C. Madrid	Rafa-B	LV	n.d	n.d	M	MON-1	LOMBARDI	920	920 b	1, 2, 3
IK-121	MHOM/ES/2000/LLM-931	2000	Cataluña	E517-M	LV	POS	>18	n.d	MON-1	A	626	626b	2
IK-122	MHOM/ES/1993/LLM-404	1993	C. Madrid	Torre-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-123	MHOM/ES/1990/LLM-195	1990	C. Madrid	58140-M	LV	n.d	n.d	n.d	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-124	MHOM/ES/1992/LLM-333	1992	Castilla- LM	Jiro-M	LV	POS	n.d	n.d	MON-1	A	626	626b	2, 3
IK-125	MHOM/ES/1995/LLM-450	1995	C. Madrid	Collado-M	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-126	MHOM/ES/1995/LLM-442	1995	C. Madrid	Maíz-M	LV	POS	33	M	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-127	MHOM/ES/1992/LLM-339	1992	C. Madrid	Lova-S	LV	n.d	n.d	F	MON-1	A	626	626b	1, 2, 3
IK-128	MHOM/ES/1992/LLM-312	1992	C. Madrid	Anastasio	LV	POS	38	M	MON-1	LISA	920	n.d	2, 3
IK-129	MHOM/ES/1991/LLM-301	1991	C. Madrid	Clemente-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-130	MHOM/ES/1991/LLM-317	1991	C. Madrid	Arenas-P	LC	n.d	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-131	MHOM/ES/1992/LLM-341	1992	Castilla/León	Justo-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-132	MHOM/ES/1995/LLM-441	1995	C. Madrid	Gonzalo-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3

Anexo 1 (continuación). Información clínico epidemiológicos de tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* obtenidos a partir de casos humanos utilizados en este estudio (n=475).

Código Lab	Código OMS	Año	Origen	Cepa	Forma	VIH	Edad	Sexo	Zimodema	Tipo ITS	ST-K26	Subgrupo K26	Capítulo
IK-133	MHOM/ES/1995/LLM-443	1995	C. Madrid	Gil-M	LV	POS	n.d	F	MON-24	LOMBARDI	962/920	n.d	1, 2, 3
IK-134	MHOM/ES/1995/LLM-456	1995	C. Madrid	Carlos-M	LV	NEG	58	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-135	MHOM/ES/1995/LLM-465	1995	C. Madrid	Fraile-M	LV	POS	35	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-136	MHOM/ES/1995/LLM-485	1995	C. Madrid	Mona-M	LV	POS	26	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-137	MHOM/ES/1995/LLM-529	1995	C. Madrid	Guayac-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	878	n.d	2, 3
IK-138	MHOM/ES/1996/LLM-569	1996	C. Madrid	Jose-M	LV	POS	n.d	n.d	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-139	MHOM/ES/1996/LLM-575	1996	C. Madrid	Salva-M	LV	POS	34	M	MON-24	LISA	920	n.d	2, 3
IK-140	MHOM/ES/1996/LLM-576	1996	C. Madrid	Ceci-M	LV	POS	26	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-141	MHOM/ES/1996/LLM-587	1996	C. Madrid	Mauro-P	LC	POS	68	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-142	MHOM/ES/1996/LLM-598	1996	C. Madrid	991-M	LV	POS	26	M	MON-24	LOMBARDI	962	962 c	1, 2, 3
IK-143	MHOM/ES/1997/LLM-613	1997	Galicia	Rial-M	LV	POS	36	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-144	MHOM/ES/1997/LLM-621	1997	Andalucía	Domi-M	LV	NEG	35	M	MON-24	LOMBARDI	836	n.d	2
IK-145	MHOM/ES/1997/LLM-707	1997	C. Madrid	E38-M	LV	POS	38	n.d	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2, 3
IK-146	MHOM/ES/1997/LLM-711	1997	C. Madrid	E36-M	LV	POS	47	n.d	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-147	MHOM/ES/1997/LLM-713	1997	C. Madrid	Cortes-P	LC	POS	33	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-148	MHOM/ES/1997/LLM-714	1997	I. Baleares	Sango-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	836	n.d	2
IK-149	MHOM/ES/1998/LLM-730	1998	C. Madrid	E111-M	LV	POS	25	n.d	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-150	MHOM/ES/1998/LLM-770	1998	Andalucía	E207-M	LV	POS	28	n.d	MON-24	A	794	n.d	2
IK-151	MHOM/ES/1998/LLM-779	1998	C. Madrid	Blanco-M	LV	POS	43	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-152	MHOM/ES/1998/LLM-811	1998	I. Baleares	E321-M	LV	POS	>18	n.d	MON-24	A	920/626	n.d	2
IK-153	MHOM/ES/1998/LLM-813	1998	Andalucía	E341-M	LV	POS	47	n.d	MON-24	A	878	n.d	2
IK-154	MHOM/ES/1999/LLM-845	1999	C. Madrid	Ortega-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-155	MHOM/ES/1999/LLM-846	1999	I. Baleares	E1499-M	LV	POS	>18	n.d	MON-24	A	626	626b	2
IK-156	MHOM/ES/1999/LLM-850	1999	I. Baleares	Coll (SD)	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	836	836 a	2
IK-157	MHOM/ES/1999/LLM-863	1999	Cataluña	E473-M	LV	POS	>18	n.d	MON-24	A	962	n.d	2
IK-158	MHOM/ES/1999/LLM-864	1999	Castilla- LM	Llanillo-M	LV	POS	33	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2, 3
IK-159	MHOM/ES/1999/LLM-892	1999	Cataluña	E467-M	LV	POS	>18	n.d	MON-24	LISA	962	n.d	2
IK-160	MHOM/ES/2000/LLM-946	2000	Galicia	Astilleros-B	LV	POS	29	M	MON-24	A	626	626b	2, 3
IK-161	MHOM/ES/2000/LLM-957	2000	C. Madrid	Peralta-M	LV	n.d	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-162	MHOM/ES/2000/LLM-961	2000	I. Baleares	Arber-M	LV	n.d	n.d	F	MON-24	A	626	n.d	2
IK-163	MHOM/ES/2001/LLM-1027	2001	C. Madrid	Mostoles-M	LV	POS	n.d	n.d	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-164	MHOM/ES/2001/LLM-1032	2001	C. Madrid	Visada-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-165	MHOM/ES/2001/LLM-1065	2001	C. Madrid	Santi-M	LV	POS	33	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-166	MHOM/ES/2001/LLM-1078	2001	C. Madrid	Montes-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-167	MHOM/ES/2001/LLM-1105	2001	Castilla- LM	Abajo	LV	NEG	19	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-168	MHOM/ES/2001/LLM-982	2001	C. Madrid	Ropelg-M	LV	POS	40	F	MON-24	LOMBARDI	878	878b	1, 2, 3
IK-169	MHOM/ES/2002/LLM-1175	2002	Andalucía	Mañas-M	LV	POS	37	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-170	MHOM/ES/2002/LLM-1177	2002	C. Madrid	Fabi-P	LC	NEG	n.d	F	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-171	MHOM/ES/2002/LLM-1183	2002	Andalucía	Depa-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	A	878	878 a	2
IK-172	MHOM/ES/2002/LLM-1211	2002	Castilla- LM	Icierra-M	LV	NEG	3	F	MON-24	LOMBARDI	962/878	n.d	2, 3
IK-173	MHOM/ES/2003/LLM-1303	2003	Castilla- LM	Rio-M	LV	POS	50	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2, 3
IK-174	MHOM/ES/2003/LLM-1305	2003	C. Madrid	Parde-M	LV	POS	33	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-175	MHOM/ES/2004/LLM-1346	2004	C. Madrid	Lemos-M	LV	POS	40	M	MON-24	LOMBARDI	962/878	962a/878b	1, 2, 3
IK-176	MHOM/ES/2004/LLM-1367	2004	C. Madrid	Perea-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-177	MHOM/ES/2004/LLM-1379	2004	Andalucía	Mogo-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	A	626	626a	2
IK-178	MHOM/ES/2004/LLM-1402	2004	Castilla- LM	Eliot-M	LV	NEG	<1	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-179	MHOM/ES/2005/LLM-1475	2005	C. Madrid	Carri-P	LC	NEG	2	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-180	MHOM/ES/2005/LLM-1478	2005	C. Madrid	Lia-M	LV	NEG	60	F	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-181	MHOM/ES/2005/LLM-1479	2005	Andalucía	Cortes-P	LC	POS	39	M	MON-24	A	962	n.d	2
IK-182	MHOM/ES/2005/LLM-1525	2005	C. Madrid	Yomara-M	LV	NEG	<1	F	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-183	MHOM/ES/2005/LLM-1526	2005	C. Madrid	GMA-M	LV	n.d	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-184	MHOM/ES/1992/LLM-334	1992	C. Madrid	Cuadros-S	LV	POS	32	M	MON-183	LOMBARDI	962/878	n.d	2, 3
IK-185	MHOM/ES/1992/LLM-336	1992	Andalucía	Garrido_M2	LV	POS	32	M	MON-183	A	962	n.d	2, 3
IK-186	MHOM/ES/1995/LLM-444	1995	Andalucía	Carmona-M	LV	POS	22	M	MON-183	LOMBARDI	878	878b	2, 3
IK-187	MHOM/ES/1997/LLM-614	1997	Valencia	Valencia-M	LV	POS	30	n.d	MON-183	A	920	n.d	2
IK-188	MHOM/ES/1997/LLM-667	1997	C. Madrid	Tirez-M	LV	n.d	n.d	M	MON-183	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-189	MHOM/ES/1998/LLM-736	1998	Andalucía	E64/M	LV	POS	36	n.d	MON-183	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-190	MHOM/ES/2000/LLM-942	2000	Andalucía	E-544-M	LV	POS	35	n.d	MON-183	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-191	MHOM/ES/2002/LLM-1208	2002	C. Madrid	Laporta-B	LV	POS	36	M	MON-183	A	920/878	n.d	2, 3
IK-192	MHOM/ES/2004/LLM-1364	2004	Valencia	Toledo-M	LV	NEG	n.d	M	MON-183	A	962	n.d	2
IK-193	MHOM/ES/2004/LLM-1376	2004	Andalucía	Maldo-M	LV	n.d	39	M	MON-183	A	962/878	n.d	2, 3
IK-194	MHOM/ES/1995/LLM-455	1995	C. Madrid	Raya-M	LV	NEG	n.d	M	MON-253	A	626	626a	2, 3
IK-195	MHOM/ES/1996/LLM-580	1996	C. Madrid	MARGA-M	LV	POS	n.d	F	MON-253	A	626	626b	2, 3
IK-196	MHOM/ES/1996/LLM-583	1996	C. Madrid	NUÑEZ-M	LV	NEG	n.d	M	MON-253	A	626	626a	2, 3
IK-197	MHOM/ES/1997/LLM-710	1997	Cataluña	E59/M	LV	POS	25	n.d	MON-253	A	626	626a	2
IK-198	MHOM/ES/1998/LLM-735	1998	Cataluña	E166/M	LV	POS	30	n.d	MON-253	A	626	626a	2

Anexo 1 (continuación). Información clínico epidemiológicos de tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* obtenidos a partir de casos humanos utilizados en este estudio (n=475).

Código Lab	Código OMS	Año	Origen	Cepa	Forma	VIH	Edad	Sexo	Zimodema	Tipo ITS	ST-K26	Subgrupo K26	Capítulo
IK-133	MHOM/ES/1995/LLM-443	1995	C. Madrid	Gil-M	LV	POS	n.d	F	MON-24	LOMBARDI	962/920	n.d	1, 2, 3
IK-134	MHOM/ES/1995/LLM-456	1995	C. Madrid	Carlos-M	LV	NEG	58	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-135	MHOM/ES/1995/LLM-465	1995	C. Madrid	Fraile-M	LV	POS	35	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-136	MHOM/ES/1995/LLM-485	1995	C. Madrid	Mona-M	LV	POS	26	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-137	MHOM/ES/1995/LLM-529	1995	C. Madrid	Guayac-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	878	n.d	2, 3
IK-138	MHOM/ES/1996/LLM-569	1996	C. Madrid	Jose-M	LV	POS	n.d	n.d	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-139	MHOM/ES/1996/LLM-575	1996	C. Madrid	Salva-M	LV	POS	34	M	MON-24	LISA	920	n.d	2, 3
IK-140	MHOM/ES/1996/LLM-576	1996	C. Madrid	Ceci-M	LV	POS	26	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-141	MHOM/ES/1996/LLM-587	1996	C. Madrid	Mauro-P	LC	POS	68	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-142	MHOM/ES/1996/LLM-598	1996	C. Madrid	991-M Anó	LV	POS	26	M	MON-24	LOMBARDI	962	962 c	1, 2, 3
IK-143	MHOM/ES/1997/LLM-613	1997	Galicia	Rial-M	LV	POS	36	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-144	MHOM/ES/1997/LLM-621	1997	Andalucía	Domí-M	LV	NEG	35	M	MON-24	LOMBARDI	836	n.d	2
IK-145	MHOM/ES/1997/LLM-707	1997	C. Madrid	E38-M	LV	POS	38	n.d	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2, 3
IK-146	MHOM/ES/1997/LLM-711	1997	C. Madrid	E36-M	LV	POS	47	n.d	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-147	MHOM/ES/1997/LLM-713	1997	C. Madrid	Cortes-P	LC	POS	33	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-148	MHOM/ES/1997/LLM-714	1997	I. Baleares	Sango-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	836	n.d	2
IK-149	MHOM/ES/1998/LLM-730	1998	C. Madrid	E111-M	LV	POS	25	n.d	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-150	MHOM/ES/1998/LLM-770	1998	Andalucía	E207-M	LV	POS	28	n.d	MON-24	A	794	n.d	2
IK-151	MHOM/ES/1998/LLM-779	1998	C. Madrid	Blanco-M	LV	POS	43	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-152	MHOM/ES/1998/LLM-811	1998	I. Baleares	E321-M	LV	POS	>18	n.d	MON-24	A	920/626	n.d	2
IK-153	MHOM/ES/1998/LLM-813	1998	Andalucía	E341-M	LV	POS	47	n.d	MON-24	A	878	n.d	2
IK-154	MHOM/ES/1999/LLM-845	1999	C. Madrid	Ortega-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-155	MHOM/ES/1999/LLM-846	1999	I. Baleares	E1499-M	LV	POS	>18	n.d	MON-24	A	626	626b	2
IK-156	MHOM/ES/1999/LLM-850	1999	I. Baleares	Coll (SD)	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	836	836 a	2
IK-157	MHOM/ES/1999/LLM-863	1999	Cataluña	E473-M	LV	POS	>18	n.d	MON-24	A	962	n.d	2
IK-158	MHOM/ES/1999/LLM-864	1999	Castilla- LM	Llanillo-M	LV	POS	33	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2, 3
IK-159	MHOM/ES/1999/LLM-892	1999	Cataluña	E467-M	LV	POS	>18	n.d	MON-24	LISA	962	n.d	2
IK-160	MHOM/ES/2000/LLM-946	2000	Galicia	Astilleros-B	LV	POS	29	M	MON-24	A	626	626b	2, 3
IK-161	MHOM/ES/2000/LLM-957	2000	C. Madrid	Peralta-M	LV	n.d	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-162	MHOM/ES/2000/LLM-961	2000	I. Baleares	Arber-M	LV	n.d	n.d	F	MON-24	A	626	n.d	2
IK-163	MHOM/ES/2001/LLM-1027	2001	C. Madrid	Mostoles-M	LV	POS	n.d	n.d	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-164	MHOM/ES/2001/LLM-1032	2001	C. Madrid	Visada-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-165	MHOM/ES/2001/LLM-1065	2001	C. Madrid	Santi-M	LV	POS	33	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-166	MHOM/ES/2001/LLM-1078	2001	C. Madrid	Montes-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-167	MHOM/ES/2001/LLM-1105	2001	Castilla- LM	Abajo	LV	NEG	19	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-168	MHOM/ES/2001/LLM-982	2001	C. Madrid	Ropelg-M	LV	POS	40	F	MON-24	LOMBARDI	878	878b	1, 2, 3
IK-169	MHOM/ES/2002/LLM-1175	2002	Andalucía	Mañas-M	LV	POS	37	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-170	MHOM/ES/2002/LLM-1177	2002	C. Madrid	Fabi-P	LC	NEG	n.d	F	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-171	MHOM/ES/2002/LLM-1183	2002	Andalucía	Depa-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	A	878	878 a	2
IK-172	MHOM/ES/2002/LLM-1211	2002	Castilla- LM	Icierra-M	LV	NEG	3	F	MON-24	LOMBARDI	962/878	n.d	2, 3
IK-173	MHOM/ES/2003/LLM-1303	2003	Castilla- LM	Rio-M	LV	POS	50	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2, 3
IK-174	MHOM/ES/2003/LLM-1305	2003	C. Madrid	Parde-M	LV	POS	33	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-175	MHOM/ES/2004/LLM-1346	2004	C. Madrid	Lemos-M	LV	POS	40	M	MON-24	LOMBARDI	962/878	962a/878b	1, 2, 3
IK-176	MHOM/ES/2004/LLM-1367	2004	C. Madrid	Perea-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-177	MHOM/ES/2004/LLM-1379	2004	Andalucía	Mogo-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	A	626	626a	2
IK-178	MHOM/ES/2004/LLM-1402	2004	Castilla- LM	Eliot-M	LV	NEG	<1	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-179	MHOM/ES/2005/LLM-1475	2005	C. Madrid	Carri-P	LC	NEG	2	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-180	MHOM/ES/2005/LLM-1478	2005	C. Madrid	Lia-M	LV	NEG	60	F	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-181	MHOM/ES/2005/LLM-1479	2005	Andalucía	Cortes-P	LC	POS	39	M	MON-24	A	962	n.d	2
IK-182	MHOM/ES/2005/LLM-1525	2005	C. Madrid	Yomara-M	LV	NEG	<1	F	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	1, 2, 3
IK-183	MHOM/ES/2005/LLM-1526	2005	C. Madrid	GMA-M	LV	n.d	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-184	MHOM/ES/1992/LLM-334	1992	C. Madrid	Cuadros-S	LV	POS	32	M	MON-183	LOMBARDI	962/878	n.d	2, 3
IK-185	MHOM/ES/1992/LLM-336	1992	Andalucía	Garrido_M2	LV	POS	32	M	MON-183	A	962	n.d	2, 3
IK-186	MHOM/ES/1995/LLM-444	1995	Andalucía	Carmona-M	LV	POS	22	M	MON-183	LOMBARDI	878	878b	2, 3
IK-187	MHOM/ES/1997/LLM-614	1997	Valencia	Valencia-M	LV	POS	30	n.d	MON-183	A	920	n.d	2
IK-188	MHOM/ES/1997/LLM-667	1997	C. Madrid	Tirez-M	LV	n.d	n.d	M	MON-183	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-189	MHOM/ES/1998/LLM-736	1998	Andalucía	E64/M	LV	POS	36	n.d	MON-183	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-190	MHOM/ES/2000/LLM-942	2000	Andalucía	E-544-M	LV	POS	35	n.d	MON-183	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-191	MHOM/ES/2002/LLM-1208	2002	C. Madrid	Laporta-B	LV	POS	36	M	MON-183	A	920/878	n.d	2, 3
IK-192	MHOM/ES/2004/LLM-1364	2004	Valencia	Toledo-M	LV	NEG	n.d	M	MON-183	A	962	n.d	2
IK-193	MHOM/ES/2004/LLM-1376	2004	Andalucía	Maldo-M	LV	n.d	39	M	MON-183	A	962/878	n.d	2, 3
IK-194	MHOM/ES/1995/LLM-455	1995	C. Madrid	Raya-M	LV	NEG	n.d	M	MON-253	A	626	626a	2, 3
IK-195	MHOM/ES/1996/LLM-580	1996	C. Madrid	MARGA-M	LV	POS	n.d	F	MON-253	A	626	626b	2, 3
IK-196	MHOM/ES/1996/LLM-583	1996	C. Madrid	NUÑEZ-M	LV	NEG	n.d	M	MON-253	A	626	626a	2, 3
IK-197	MHOM/ES/1997/LLM-710	1997	Cataluña	E59/M	LV	POS	25	n.d	MON-253	A	626	626a	2
IK-198	MHOM/ES/1998/LLM-735	1998	Cataluña	E166/M	LV	POS	30	n.d	MON-253	A	626	626a	2

Anexo 1 (continuación). Información clínico epidemiológicos de tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* obtenidos a partir de casos humanos utilizados en este estudio (n=475).

Código Lab	Código OMS	Año	Origen	Cepa	Forma	VIH	Edad	Sexo	Zimodema	Tipo ITS	ST-K26	Subgrupo K26	Capítulo
IK-199	MHOM/ES/1998/LLM-737	1998	Cataluña	E101/M	LV	POS	36	n.d	MON-253	A	626	626a	2
IK-200	MHOM/ES/1998/LLM-742	1998	Valencia	E203/M	LV	POS	48	n.d	MON-253	A	626	626a	2
IK-201	MHOM/ES/2000/LLM-927	2000	Cataluña	E-529-M	LV	POS	34	n.d	MON-253	A	626	626a	2, 3
IK-202	MHOM/ES/2003/LLM-1230	2003	C. Madrid	Large-M	LV	POS	>18	M	MON-253	A	626	626a	2, 3
IK-203	MHOM/ES/1991/LLM-236	1991	Cataluña	BCN-65	LV	n.d	n.d	n.d	MON-28	A	626	n.d	2
IK-204	MHOM/ES/1992/LLM-370	1992	Valencia	Arce-Bz	LV	POS	n.d	M	MON-28	A	1300	n.d	2, 3
IK-205	MHOM/ES/1998/LLM-738	1998	C. Madrid	Ochoa-M	LV	POS	n.d	M	MON-28	A	920	n.d	2, 3
IK-206	MHOM/ES/2000/LLM-953	2000	Extremadura	Julia	LV	POS	n.d	F	MON-28	A	1300	n.d	2, 3
IK-207*	MHOM/ES/2000/LLM-959	2000	Valencia	Holt-P	LC	NEG	58	F	MON-28	LISA	920	n.d	2
IK-209*	MHOM/ES/1991/LLM-309	1991	Valencia	Francisco-M	LV	n.d	n.d	M	MON-29	LISA	920	n.d	2, 3
IK-211	MHOM/ES/1991/LLM-311	1991	C. Madrid	Natalio-M	LV	POS	32	M	MON-29	LISA	920	n.d	2, 3
IK-212	MHOM/ES/1995/LLM-483	1995	Valencia	LLido-P	LC	NEG	2	M	MON-29	B	878	878b	2
IK-213	MHOM/ES/1998/LLM-727	1998	C. Madrid	E25/M	LV	POS	>18	n.d	MON-29	A	836	n.d	2, 3
IK-214	MHOM/ES/1998/LLM-778	1998	Castilla- LM	Bautista-M	LV	POS	32	M	MON-29	A	920	n.d	2, 3
IK-215	MHOM/ES/2000/LLM-949	2000	I. Baleares	Damian-P	LC	n.d	n.d	M	MON-29	A	962	n.d	2, 3
IK-216	MHOM/ES/2000/LLM-965	2000	Andalucía	E-578-M	LV	POS	28	n.d	MON-29	A	962	n.d	2
IK-217	MHOM/ES/2001/LLM-997	2001	Valencia	Murcia-P	LC	NEG	58	M	MON-29	LISA	920	n.d	2
IK-218	MHOM/ES/2005/LLM-1519	2005	Valencia	Monzo-M	LV	NEG	1	F	MON-29	A	1300	n.d	2
IK-219	MHOM/ES/1986/LLM-116	1986	C. Madrid	Oscar-M	LV	POS	36	M	MON-33	LISA	962	n.d	2, 3
IK-220	MHOM/ES/1990/LLM-200	1990	C. Madrid	59933-M	LV	POS	27	M	MON-33	LISA	1300/1100	n.d	2
IK-221	MHOM/ES/1991/LLM-047	1991	C. Madrid	Santo-S	LV	POS	n.d	M	MON-33	A	920	n.d	2
IK-222	MHOM/ES/1991/LLM-304	1991	C. Madrid	Tejucar-M	LV	POS	23	M	MON-33	B	962	n.d	2
IK-223	MHOM/ES/1992/LLM-316	1992	C. Madrid	Angel-M	LV	n.d	n.d	M	MON-33	LISA	1300/1100	n.d	2
IK-224	MHOM/ES/1997/LLM-612	1997	Valencia	Guillo-M	LV	n.d	n.d	M	MON-33	LISA	920	n.d	2
IK-225	MHOM/ES/2005/LLM-1518	2005	Andalucía	Utre-M2	LV	POS	43	M	MON-33	A	836	n.d	2, 3
IK-226	MHOM/ES/1999/LLM-840	1999	Andalucía	E418/M	LV	POS	30	n.d	MON-27	A	794	n.d	2
IK-227*	MHOM/ES/2001/LLM-1036	2001	C. Madrid	Claudio-M	LV	POS	42	M	MON-27	LOMBARDI	836	n.d	2
IK-229	MHOM/ES/2003/LLM-1254	2003	C. Madrid	Bravo-M	LV	POS	44	M	MON-27	LOMBARDI	836	n.d	2
IK-230	MHOM/ES/1995/LLM-528	1995	C. Madrid	Rafa-M	LV	POS	n.d	M	MON-80	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-231	MHOM/ES/2000/LLM-969	2000	I. Baleares	E-584-M	LV	POS	43	n.d	MON-80	A	920/878	n.d	2, 3
IK-232	MHOM/ES/2001/LLM-1095	2001	C. Madrid	Luisa-B	LV	NEG	76	F	MON-80	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-233	MHOM/ES/1996/LLM-597	1996	C. Madrid	JUANCA-M	LV	POS	32	M	MON-108	A	626	626a	2
IK-234	MHOM/ES/1999/LLM-827	1999	Cataluña	BCN 214	LV	NEG	70	M	MON-105	A	836	n.d	2
IK-235	MHOM/ES/2001/LLM-1026	2001	C. Madrid	Peque-M	LV	POS	31	M	MON-105	A	626	626b	2
IK-236	MHOM/ES/1991/LLM-299	1991	I. Baleares	Massa-M	LV	n.d	n.d	M	MON-34	A	920	n.d	2
IK-237	MHOM/ES/1991/LLM-327	1991	I. Baleares	Segui-M	LV	NEG	44	M	MON-34	A	626	626b	2
IK-238	MHOM/ES/1992/LLM-318	1992	C. Madrid	Zamora-P	LC	NEG	n.d	n.d	MON-34	LOMBARDI	962/878	n.d	2
IK-239	MHOM/ES/1992/LLM-332	1992	C. Madrid	Javier-P	LC	NEG	n.d	M	MON-34	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-240	MHOM/ES/1995/LLM-448	1995	C. Madrid	Rodri-M	LV	NEG	n.d	n.d	MON-34	A	1100/962	n.d	2
IK-241	MHOM/ES/1995/LLM-531	1995	C. Madrid	Palacios-BH	LV	POS	31	M	MON-34	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-242	MHOM/ES/1995/LLM-537	1995	I. Baleares	Juan-M	LV	NEG	n.d	M	MON-34	A	962	n.d	2
IK-243	MHOM/ES/1995/LLM-541	1995	I. Baleares	Valero-M	LV	POS	n.d	M	MON-34	A	962	n.d	2
IK-244	MHOM/ES/1996/LLM-566	1996	C. Madrid	ISA-M	LV	POS	30	F	MON-34	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-245	MHOM/ES/1996/LLM-592	1996	I. Baleares	NICO-M	LV	POS	n.d	M	MON-34	A	962	n.d	2
IK-246	MHOM/ES/1997/LLM-630	1997	Andalucía	Castro-B	LV	NEG	25	M	MON-34	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-247	MHOM/ES/1997/LLM-631	1997	C. Madrid	Rasco-P	LC	n.d	n.d	M	MON-34	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-248*	MHOM/ES/1997/LLM-637	1997	I. Baleares	Aledo-M	LV	n.d	n.d	M	MON-34	A	962	n.d	2
IK-250	MHOM/ES/1998/LLM-723	1998	Andalucía	E65/M	LV	POS	33	n.d	MON-34	A	962	n.d	2
IK-251	MHOM/ES/1998/LLM-729	1998	Andalucía	E46/M	LV	POS	41	n.d	MON-34	A	836	n.d	2
IK-252	MHOM/ES/1998/LLM-733	1998	Andalucía	E63/M	LV	POS	30	n.d	MON-34	A	626	626a	2
IK-253	MHOM/ES/1998/LLM-734	1998	Andalucía	E45/M	LV	POS	27	n.d	MON-34	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-254	MHOM/ES/1998/LLM-814	1998	Andalucía	E208/M	LV	POS	38	n.d	MON-34	A	836/626	n.d	2
IK-255	MHOM/ES/1999/LLM-849	1999	C. Madrid	E358/M	LV	POS	>18	n.d	MON-34	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-256	MHOM/ES/1999/LLM-879	1999	Andalucía	E-387-M	LV	POS	35	n.d	MON-34	A	962	n.d	2
IK-257	MHOM/ES/2002/LLM-1110	2002	Castilla-LM	Mohame-M	LV	NEG	2	M	MON-34	LOMBARDI	962	n.d	2, 3
IK-258	MHOM/ES/2002/LLM-1167	2002	I. Baleares	47329-M	LV	POS	n.d	F	MON-34	A	626	626a	2, 3
IK-259	MHOM/ES/2002/LLM-1188	2002	C. Madrid	Chicoher-M	LV	NEG	>18	M	MON-34	A	626	n.d	2
IK-260	MHOM/ES/2002/LLM-1193	2002	C. Madrid	Hijosa-B	LV	POS	32	M	MON-34	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-261	MHOM/ES/2002/LLM-1216	2003	C. Madrid	Alonso-M	LV	POS	n.d	M	MON-34	A	626	626b	2
IK-262	MHOM/ES/2003/LLM-1224	2003	C. Madrid	Isidoro-M	LV	POS	42	M	MON-34	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-263	MHOM/ES/2003/LLM-1316	2003	Extremadura	Migo-M	LV	POS	>18	M	MON-34	LOMBARDI	878	878a	2, 3
IK-264	MHOM/ES/1998/LLM-759	1998	Valencia	E249/M	LV	POS	40	n.d	MON-190	LISA	920	n.d	2
IK-265	MHOM/ES/1988/LLM-175	1988	C. Madrid	Daniel-M	LV	n.d	n.d	M	MON-198	A	1300	n.d	2
IK-266	MHOM/ES/1992/LLM-373	1992	C. Madrid	Vélez-M	LV	POS	n.d	M	MON-199	A	920	n.d	2
IK-267	MHOM/ES/2000/LLM-938	2000	C. Madrid	Rilo-M	LV	POS	n.d	M	MON-282	A	626	626b	2
IK-268	MHOM/ES/1999/LLM-857	1999	Andalucía	E-445-M	LV	POS	35	n.d	MON-283	LOMBARDI	962	n.d	2, 3

Anexo 1 (continuación). Información clínico epidemiológicos de tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* obtenidos a partir de casos humanos utilizados en este estudio (n=475).

Código Lab	Código OMS	Año	Origen	Cepa	Forma	VIH	Edad	Sexo	Zimodema	Tipo ITS	ST-K26	Subgrupo K26	Capítulo
IK-269	MHOM/ES/1999/LLM-855	1999	Andalucía	E-390-M	LV	POS	57	n.d	MON-284	A	878	n.d	2
IK-270	MHOM/ES/2000/LLM-971	2000	Extremadura	Ayer	LV	POS	n.d	M	MON-284	A	878	n.d	2, 3
IK-271	MHOM/ES/1997/LLM-615	1997	Andalucía	Niña-M	LV	NEG	8	F	MON-285	A	1100	n.d	2
IK-272	MHOM/ES/1995/LLM-445	1995	C. Madrid	RRR-M	LV	POS	n.d	F	MON-302	A	920	n.d	2
IK-273	MHOM/ES/1996/LLM-564	1996	Extremadura	ENRI-M	LV	NEG	3	M	MON-302	LOMBARDI	920	n.d	2, 3
IK-274	MHOM/ES/1998/LLM-751	1998	Valencia	E205/M	LV	POS	33	n.d	MON-302	A	920	n.d	2
IK-275	MHOM/ES/1999/LLM-859	1999	Valencia	Pascual-M	LV	POS	n.d	M	MON-302	A	1300	n.d	2
IK-276	MHOM/ES/1999/LLM-908	1999	Andalucía	E-518-M	LV	POS	34	n.d	MON-302	A	962	n.d	2
IK-277	MHOM/ES/2000/LLM-940	2000	Andalucía	E-542-M	LV	POS	35	n.d	MON-302	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-278	MHOM/ES/2002/LLM-1178	2002	Valencia	Más-M	LV	POS	n.d	M	MON-302	A	962	n.d	2
IK-279	MHOM/ES/2012/LLM-2108	2012	C. Madrid	Quintas-P	LC	NEG	34	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-280	MHOM/ES/2012/LLM-2116	2012	C. Madrid	Abra-P	LC	NEG	29	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-281	MHOM/ES/2012/LLM-2122	2012	C. Madrid	Tarka-P	LC	NEG	5	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-282	MHOM/ES/2012/LLM-2110	2012	C. Madrid	Lonso-P	LC	NEG	54	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-283	MHOM/ES/2012/LLM-2123	2012	C. Madrid	Kingu-S	LV	n.d	8	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-284	MHOM/ES/2012/LLM-2120	2012	C. Madrid	Oran-P	LC	n.d	57	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-285	MHOM/ES/2012/LLM-2121	2012	C. Madrid	Bece-S8	LV	n.d	47	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-286	MHOM/ES/2012/LLM-2114	2012	C. Madrid	Biso-M	LV	n.d	45	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-287	MHOM/ES/2012/LLM-2127	2012	C. Madrid	Ocam-P	LV	n.d	31	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-288	MHOM/ES/2012/LLM-2125	2012	C. Madrid	Peji-M	LV	n.d	45	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-289	MHOM/ES/2012/LLM-2124	2012	C. Madrid	Buja-P	LC	n.d	68	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-290	MHOM/ES/2012/LLM-2133	2012	C. Madrid	Ancos-P	LC	n.d	56	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-291	MHOM/ES/2012/LLM-2128	2012	C. Madrid	Olmos-P	LC	n.d	49	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-292	MHOM/ES/2012/LLM-2132	2012	C. Madrid	Piñe-P	LC	n.d	56	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-293	MHOM/ES/2012/LLM-2129	2012	C. Madrid	Fipa-P	LC	n.d	65	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-294	MHOM/ES/2012/LLM-2130	2012	C. Madrid	Bece-S9	LV	n.d	47	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-295	MHOM/ES/2012/LLM-2138	2012	C. Madrid	Dino-P	LC	n.d	23	F	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-296*	MHOM/ES/2012/LLM-2135	2012	C. Madrid	Victor-S2	LV	n.d	38	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-298	MHOM/ES/2012/LLM-2142	2012	C. Madrid	Ines-P	LC	NEG	<1	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-299	MHOM/ES/2012/LLM-2141	2012	C. Madrid	Jugu-M	LV	n.d	54	F	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-300	MHOM/ES/2012/LLM-2144	2012	C. Madrid	Chris-P	LC	n.d	1	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-301	MHOM/ES/2012/LLM-2147	2012	C. Madrid	Diga-P	LC	n.d	54	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-302*	MHOM/ES/2011/LLM-1944	2011	C. Madrid	Nieto-P	LC	n.d	66	F	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-304	MHOM/ES/1991/LLM-ND	1991	C. Madrid	Paulo	LV	n.d	26	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-305	MHOM/ES/1992/LLM-337	1992	C. Madrid	Rojas-B	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-306	MHOM/ES/1992/LLM-341	1992	C. Madrid	Justo-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	N.A	n.d	2
IK-307	MHOM/ES/1992/LLM-379	1992	C. Madrid	Cilleros-M	LV	POS	n.d	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-308	MHOM/ES/1993/LLM-384	1993	C. Madrid	Moreno-M	LV	POS	25	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-309	MHOM/ES/1993/LLM-388	1993	C. Madrid	Puma-M	LV	POS	n.d	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-310	MHOM/ES/1993/LLM-395	1993	C. Madrid	Navarro-P	LC	POS	31	M	n.d	A	920	n.d	2
IK-311	MHOM/ES/1993/LLM-396	1993	C. Madrid	Cruz-M	LV	POS	22	F	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-312	MHOM/ES/1993/LLM-397	1993	C. Madrid	Russo-M	LV	n.d	n.d	F	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-313	MHOM/ES/1996/LLM-599	1996	C. Madrid	Cutillas-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-314	MHOM/ES/1996/LLM-588	1996	C. Madrid	Cono-P	LC	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-315	MHOM/ES/1993/LLM-392	1993	C. Madrid	Lang-M	LV	NEG	61	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-316	MHOM/ES/1993/LLM-399	1993	C. Madrid	Rey-M2	LV	POS	33	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-317	MHOM/ES/1993/LLM-400	1993	C. Madrid	Castro-M	LV	POS	29	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-318	MHOM/ES/1993/LLM-401	1993	C. Madrid	Eloy-M	LV	POS	n.d	M	n.d	LOMBARDI	920/878	n.d	2
IK-319	MHOM/ES/1993/LLM-408	1993	C. Madrid	Sobrino-M	LV	POS	n.d	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-320	MHOM/ES/2013/LLM-2153	2013	C. Madrid	Roal-P	LC	n.d	36	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-321	MHOM/ES/2013/LLM-2151	2013	C. Madrid	Borre-P	LC	n.d	65	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-322	MHOM/ES/2013/LLM-2155	2013	C. Madrid	Salce-M	LV	n.d	25	F	n.d	A	626	n.d	2
IK-323	MHOM/ES/2013/LLM-2168	2013	C. Madrid	Cama-M	LV	n.d	51	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-324	MHOM/ES/2013/LLM-2158	2013	C. Madrid	Tinez-P	LC	n.d	38	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-325	MHOM/ES/2013/LLM-2162	2013	C. Madrid	Prieto-P	LC	n.d	37	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-326*	MHOM/ES/2013/LLM-2163	2013	C. Madrid	Nava-S	LV	NEG	71	M	n.d	A	920	n.d	2
IK-328	MHOM/ES/2013/LLM-2166	2013	C. Madrid	Lofe-M	LV	POS	45	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-329	MHOM/ES/2013/LLM-2159	2013	C. Madrid	Anca-M	LV	NEG	61	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-330	MHOM/ES/2013/LLM-2170	2013	C. Madrid	Arnaldo-M	LV	n.d	63	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-331	MHOM/ES/2013/LLM-2180	2013	C. Madrid	Lola-S	LV	n.d	45	F	n.d	A	626	n.d	2
IK-332	MHOM/ES/1993/LLM-394	1993	C. Madrid	Egido-P	LC	POS	41	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-333	MHOM/ES/1995/LLM-487	1995	C. Madrid	JL-B	LV	POS	31	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-334	MHOM/ES/1995/LLM-533	1995	C. Madrid	Recio-M	LV	POS	29	M	MON-34	A	626	n.d	2
IK-335	MHOM/ES/1997/LLM-699	1997	C. Madrid	Macre-LG	LMC	POS	39	M	MON-34	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-336	MHOM/ES/1997/LLM-702	1997	C. Madrid	JA-M	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	920/878	n.d	2
IK-337	MHOM/ES/1997/LLM-708	1997	C. Madrid	E-11-M	LV	POS	n.d	n.d	MON-34	LOMBARDI	920	n.d	2

Anexo 1 (continuación). Información clínico epidemiológicos de tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* obtenidos a partir de casos humanos utilizados en este estudio (n=475).

Código Lab	Código OMS	Año	Origen	Cepa	Forma	VIH	Edad	Sexo	Zimodema	Tipo ITS	ST-K26	Subgrupo K26	Capítulo
IK-338	MHOM/ES/1997/LLM-709	1997	C. Madrid	E-17-M	LV	POS	n.d	n.d	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-339	MHOM/ES/1998/LLM-768	1998	C. Madrid	E-235-M	LV	POS	n.d	n.d	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-340	MHOM/ES/1998/LLM-769	1998	C. Madrid	E-257-M	LV	POS	n.d	n.d	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-341	MHOM/ES/1998/LLM-774	1998	C. Madrid	E-233-M	LV	POS	n.d	n.d	MON-24	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-342	MHOM/ES/1999/LLM-843	1999	C. Madrid	E-358-B	LV	POS	n.d	n.d	MON-34	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-343	MHOM/ES/1993/LLM-403	1993	C. Madrid	Alegria-M	LV	POS	35	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-344	MHOM/ES/1994/LLM-405	1994	C. Madrid	Orduña-M	LV	POS	n.d	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-345	MHOM/ES/1994/LLM-409	1994	C. Madrid	Salazar-M	LV	POS	n.d	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-346	MHOM/ES/1994/LLM-426	1994	C. Madrid	Vicente-M	LV	POS	n.d	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-347	MHOM/ES/1995/LLM-446	1995	C. Madrid	Carbonel-B	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	n.d	2
IK-348	MHOM/ES/1995/LLM-449	1995	C. Madrid	Rosa-M	LV	POS	n.d	F	MON-34	A	626	n.d	2
IK-349	MHOM/ES/1995/LLM-453	1995	C. Madrid	Diana-M	LV	POS	36	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-350	MHOM/ES/1994/LLM-416	1994	C. Madrid	Raquel-M	LV	NEG	<1	F	n.d	A	626	n.d	2
IK-351	MHOM/ES/1995/LLM-447	1995	C. Madrid	Ferji-PE	LV	POS	n.d	M	MON-34	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-352	MHOM/ES/2001/LLM-1087	2001	C. Madrid	Ribeiro-M	LV	POS	30	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-353	MHOM/ES/2002/LLM-1194	2002	C. Madrid	Asenjo-M	LV	POS	35	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-354	MHOM/ES/2004/LLM-1350	2004	C. Madrid	Llina-M	LV	NEG	n.d	M	MON-1	LOMBARDI	878	n.d	2
IK-355	MHOM/ES/2004/LLM-1348	2004	C. Madrid	Quiros-B	LV	POS	n.d	M	MON-1	A	626	n.d	2
IK-356	MHOM/ES/2004/LLM-1371	2004	C. Madrid	Ariza-P	LV	NEG	41	M	MON-1	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-357	MHOM/ES/2004/LLM-1378	2004	C. Madrid	Cascos-P	LV	POS	n.d	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-358	MHOM/ES/2004/LLM-1375	2004	C. Madrid	Gonza-B	LV	POS	33	M	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-359	MHOM/ES/2005/LLM-1468	2005	C. Madrid	Doro-LP	LV	NEG	66	F	MON-24	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-360	MHOM/ES/2006/LLM-1567	2006	C. Madrid	Sanse-S	LV	NEG	54	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-361	MHOM/ES/2006/LLM-1570	2006	C. Madrid	Alin-m	LV	POS	n.d	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-362	MHOM/ES/2006/LLM-1576	2006	C. Madrid	Vice-M	LV	POS	54	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-363	MHOM/ES/2006/LLM-1563	2006	C. Madrid	Jamal-M	LV	NEG	21	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-364	MHOM/ES/2006/LLM-1571	2006	C. Madrid	Dero-M	LV	POS	n.d	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-365	MHOM/ES/2006/LLM-1572	2006	C. Madrid	Chu-M	LV	NEG	13	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-366	MHOM/ES/2006/LLM-1574	2006	C. Madrid	Igle-M	LV	n.d	38	M	n.d	LOMBARDI	920/878	n.d	2
IK-367	MHOM/ES/2006/LLM-1578	2006	C. Madrid	Zalez-B	LV	NEG	93	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-368	MHOM/ES/2006/LLM-1579	2006	C. Madrid	Boigo-M	LV	n.d	>18	F	n.d	A	920	n.d	2
IK-369	MHOM/ES/2007/LLM-1608	2007	C. Madrid	Mateo-S	LV	POS	>18	M	n.d	B	878	n.d	2
IK-370	MHOM/ES/2007/LLM-1610	2007	C. Madrid	Rio-M	LV	POS	n.d	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-371	MHOM/ES/2007/LLM-1619	2007	C. Madrid	Pastra-M	LV	n.d	32	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-372	MHOM/ES/2007/LLM-1616	2007	C. Madrid	Berto-P	LC	n.d	n.d	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-373*	MHOM/ES/2007/LLM-1617	2007	C. Madrid	Carre-B	LV	NEG	41	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-375	MHOM/ES/2007/LLM-1625	2007	C. Madrid	Celes-G	LG	n.d	n.d	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-376	MHOM/ES/2007/LLM-1621	2007	C. Madrid	Bece-S	LV	POS	41	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-377	MHOM/ES/2007/LLM-1624	2007	C. Madrid	Pisa-M	LV	POS	>18	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-378	MHOM/ES/2007/LLM-1627	2007	C. Madrid	Pozu-S	LG	n.d	n.d	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-379	MHOM/ES/2007/LLM-1632	2007	C. Madrid	Carpa-M	LV	NEG	2	M	n.d	A	920	n.d	2
IK-380*	MHOM/ES/2007/LLM-1634	2007	C. Madrid	Lladas-S	LV	POS	46	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-382*	MHOM/ES/2008/LLM-1677	2008	C. Madrid	Mene-M	LV	NEG	n.d	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-386	MHOM/ES/2011/LLM-1930	2011	C. Madrid	Baeza-M	LV	POS	48	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-387	MHOM/ES/2011/LLM-1928	2011	C. Madrid	Espe-M	LV	POS	53	F	n.d	A	878	n.d	2
IK-388	MHOM/ES/2011/LLM-1943	2011	C. Madrid	Gife-M	LV	n.d	70	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-389	MHOM/ES/2011/LLM-1940	2011	C. Madrid	Roma-M	LV	n.d	61	M	n.d	LOMBARDI	962/920	n.d	2
IK-390	MHOM/ES/2011/LLM-1927	2011	C. Madrid	Gono-M	LV	NEG	32	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-391	MHOM/ES/2011/LLM-1947	2011	C. Madrid	Dondo-P	LC	n.d	55	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-392	MHOM/ES/2011/LLM-1950	2011	C. Madrid	Olmo-P	LC	n.d	54	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-393	MHOM/ES/2011/LLM-1951	2011	C. Madrid	Palla-M	LV	n.d	36	M	n.d	A	626	n.d	2
IK-394	MHOM/ES/2011/LLM-1993	2011	C. Madrid	Joel-P	LC	n.d	30	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-395*	MHOM/ES/2011/LLM-1953	2011	C. Madrid	Gabri-P	LC	n.d	34	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-397	MHOM/ES/2011/LLM-2002	2011	C. Madrid	Pablo-P	LC	n.d	40	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-398	MHOM/ES/2011/LLM-2003	2011	C. Madrid	Borja-P	LC	n.d	15	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-399	MHOM/ES/2011/LLM-2041	2011	C. Madrid	Yami-S	LV	n.d	5	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-400	MHOM/ES/2011/LLM-1985	2011	C. Madrid	Ano-P	LC	n.d	59	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-401	MHOM/ES/2011/LLM-2000	2011	C. Madrid	Agudo-P	LC	n.d	65	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-402	MHOM/ES/2011/LLM-1996	2011	C. Madrid	Roldan-P	LC	n.d	80	F	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-403	MHOM/ES/2011/LLM-2004	2011	C. Madrid	Merche-P	LC	n.d	58	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-404	MHOM/ES/2011/LLM-2006	2011	C. Madrid	Vadi-P	LC	n.d	62	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-405	MHOM/ES/2011/LLM-2007	2011	C. Madrid	Adela-P	LC	n.d	60	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-406	MHOM/ES/2011/LLM-1992	2011	C. Madrid	Monte-P	LC	n.d	47	M	n.d	LOMBARDI	878	n.d	2
IK-407	MHOM/ES/2011/LLM-1987	2011	C. Madrid	Prieto-P	LC	n.d	27	F	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-408	MHOM/ES/2011/LLM-2010	2011	C. Madrid	Rosa-P	LC	n.d	60	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-409	MHOM/ES/2011/LLM-1991	2011	C. Madrid	Guhi-M	LV	n.d	33	M	n.d	A	626	n.d	2

Anexo 1 (continuación). Información clínico epidemiológicos de tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* obtenidos a partir de casos humanos utilizados en este estudio (n=475).

Código Lab	Código OMS	Año	Origen	Cepa	Forma	VIH	Edad	Sexo	Zimodema	Tipo ITS	ST-K26	Subgrupo K26	Capítulo
IK-410	MHOM/ES/2011/LLM-2012	2011	C. Madrid	Quete-P	LC	n.d	40	M	n.d	LOMBARDI	962	n.d	2
IK-411	MHOM/ES/2011/LLM-2009	2011	C. Madrid	Belen-P	LC	n.d	35	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-412	MHOM/ES/2011/LLM-2011	2011	C. Madrid	Fama-P	LC	n.d	28	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-413	MHOM/ES/2011/LLM-2013	2011	C. Madrid	Gaspar-P	LC	n.d	60	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-414	MHOM/ES/2011/LLM-2016	2011	C. Madrid	Yuste-P	LC	n.d	48	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-415	MHOM/ES/2011/LLM-2014	2011	C. Madrid	Pope-P	LC	n.d	51	F	n.d	LOMBARDI	920	n.d	2
IK-416	MHOM/ES/2008/LLM-1665	2008	C. Madrid	TONIO	LV	NEG	>18	M	n.d	LOMBARDI	962	962 d	1, 2, 3
IK-417	MHOM/ES/2008/LLM-1695	2008	C. Madrid	PEGO	LV	NEG	>18	M	n.d	LOMBARDI	836	836 a	1, 2, 3
IK-418	MHOM/ES/2008/LLM-1643	2008	C. Madrid	MAGA-S2	LV	POS	39	M	n.d	A	794	794 B	1, 2, 3
IK-419	MHOM/ES/2008/LLM-1657	2008	C. Madrid	BECE-B	LV	POS	42	M	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-420	MHOM/ES/2008/LLM-1676	2008	C. Madrid	ANMA-B	LV	NEG	>18	M	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-421	MHOM/ES/2008/LLM-1667	2008	C. Madrid	NACU-M	LV	POS	27	M	n.d	A	584	584 a	1, 2, 3
IK-422	MHOM/ES/2008/LLM-1644	2008	C. Madrid	BARQUI-M	LV	NEG	58	M	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-423	MHOM/ES/2008/LLM-1646	2008	C. Madrid	POZO-P	LC	POS	39	M	n.d	LOMBARDI	920	920 b	1, 2, 3
IK-424	MHOM/ES/2008/LLM-1653	2008	C. Madrid	EVELIN-M	LV	POS	25	M	n.d	A	584	584 a	1, 2, 3
IK-425	MHOM/ES/2008/LLM-1681	2008	C. Madrid	Deo-M	LV	POS	49	F	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-426	MHOM/ES/2009/LLM-1648	2008	C. Madrid	ALBER-B	LV	NEG	34	M	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-427	MHOM/ES/2009/LLM-1707	2009	C. Madrid	MACA-M	LV	POS	46	M	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-428	MHOM/ES/2009/LLM-1725	2009	C. Madrid	CONDE-M	LV	NEG	40	M	n.d	A	626	626a	1, 2, 3
IK-429	MHOM/ES/2009/LLM-1734	2009	C. Madrid	PLAZA-M	LV	NEG	35	M	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-430	MHOM/ES/2009/LLM-1750	2009	C. Madrid	AUREO-M	LV	NEG	80	M	n.d	LOMBARDI	920	920 c	1, 2, 3
IK-431	MHOM/ES/2009/LLM-1729	2009	C. Madrid	ESPE-P2	LC	NEG	51	F	n.d	A	794	794 A	1, 2, 3
IK-432	MHOM/ES/2009/LLM-1756	2009	C. Madrid	ZAGA-B	LV	POS	56	M	n.d	A	626	626a	1, 2, 3
IK-433	MHOM/ES/2009/LLM-1790	2009	C. Madrid	HUGO-P	LC	POS	53	M	n.d	LOMBARDI	920	920 b	1, 2, 3
IK-434	MHOM/ES/2009/LLM-1703	2009	C. Madrid	ARGA-S	LV	POS	40	M	n.d	A	626	626a	1, 2, 3
IK-435	MHOM/ES/2009/LLM-1712	2009	C. Madrid	BRU-B	LV	NEG	33	M	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-436	MHOM/ES/2009/LLM-1714	2009	C. Madrid	Peca-M	LV	NEG	61	M	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-437	MHOM/ES/2010/LLM-1896	2010	C. Madrid	ELPI-M	LV	NEG	38	M	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-438	MHOM/ES/2010/LLM-1920	2010	C. Madrid	BOZI-M	LV	NEG	1	M	n.d	LOMBARDI	962	962 d	1, 2, 3
IK-439	MHOM/ES/2010/LLM-1873	2010	C. Madrid	RAMOS-S	LV	NEG	45	M	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-440	MHOM/ES/2010/LLM-1858	2010	C. Madrid	KORBA-S	LV	NEG	30	M	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-441	MHOM/ES/2010/LLM-1859	2010	C. Madrid	SALMA-M	LV	NEG	1	F	n.d	LOMBARDI	962/920	962 c / 920 j	1, 2, 3
IK-442	MHOM/ES/2010/LLM-1888	2010	C. Madrid	ODI-S2	LV	NEG	4	F	n.d	LOMBARDI	962	962 c	1, 2, 3
IK-443	MHOM/ES/2010/LLM-1854	2010	C. Madrid	TEGA-M	LV	NEG	53	M	n.d	LOMBARDI	920	920 a	1, 2, 3
IK-444	MHOM/ES/2010/LLM-1918	2010	C. Madrid	TAZON-G	LG	NEG	57	F	n.d	LOMBARDI	962	962 c	1, 2, 3
IK-445	MHOM/ES/2010/LLM-1886	2010	C. Madrid	SATO-M	LV	NEG	25	M	n.d	LOMBARDI	920	920 j	1, 2, 3
IK-446	MHOM/ES/2010/LLM-1899	2010	C. Madrid	GONES-S	LV	POS	38	M	n.d	LOMBARDI	920	920 a	1, 2, 3
IK-447	MHOM/ES/2011/LLM-2027	2011	C. Madrid	GERMAN	LV	NEG	38	M	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-448	MHOM/ES/2011/LLM-2032	2011	C. Madrid	OMEN	LV	NEG	38	M	n.d	LOMBARDI	962/920	962 d / 920 b	1, 2, 3
IK-449	MHOM/ES/2011/LLM-2005	2011	C. Madrid	NATA-M	LV	NEG	1	F	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-450	MHOM/ES/2011/LLM-2051	2011	C. Madrid	JACA-S	LV	NEG	42	M	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-451	MHOM/ES/2011/LLM-1948	2011	C. Madrid	MIER-P	LC	NEG	71	F	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-452	MHOM/ES/2011/LLM-2033	2011	C. Madrid	YERAY-S	LV	NEG	4	M	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-453	MHOM/ES/2011/LLM-2047	2011	C. Madrid	VICTOR-S	LV	POS	35	M	n.d	A	626	626b	1, 2, 3
IK-454	MHOM/ES/2011/LLM-1946	2011	C. Madrid	FELIX-G	LG	NEG	32	M	n.d	LOMBARDI	920	920 b	1, 2, 3
IK-455	MHOM/ES/2011/LLM-2018	2011	C. Madrid	Riera-S	LV	NEG	61	M	n.d	LOMBARDI	920	920 g	1, 2, 3
IK-456	MHOM/ES/2011/LLM-2037	2011	C. Madrid	VIGA-M	LV	NEG	78	M	n.d	LOMBARDI	920	920 b	1, 2, 3
IK-457	MHOM/ES/2011/LLM-1988	2011	C. Madrid	FARI-M	LV	NEG	81	F	n.d	LOMBARDI	962	962 c	1, 2, 3
IK-458	MHOM/ES/2011/LLM-1964	2011	C. Madrid	KALA-S	LV	NEG	33	M	n.d	LOMBARDI	836	836 a	1, 2, 3
IK-459	MHOM/ES/2011/LLM-1929	2011	C. Madrid	PABLO-M	LV	NEG	50	M	n.d	LOMBARDI	920	920 j	1, 2, 3
IK-460	MHOM/ES/2011/LLM-1956	2011	C. Madrid	ESCO-M	LV	NEG	89	M	n.d	LOMBARDI	920	920 e	1, 2, 3
IK-461	MHOM/ES/2011/LLM-1974	2011	C. Madrid	COLLAD-P	LC	NEG	40	M	n.d	LOMBARDI	920	920 j	1, 2, 3
IK-462	MHOM/ES/2011/LLM-1982	2011	C. Madrid	CANTE-G	LG	NEG	55	F	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-463	MHOM/ES/2011/LLM-1983	2011	C. Madrid	JACINTA-P	LC	NEG	74	F	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-464	MHOM/ES/2011/LLM-1984	2011	C. Madrid	STOPA-M	LV	POS	39	M	n.d	LOMBARDI	962/920	962 b / 920 b	1, 2, 3
IK-465	MHOM/ES/2011/LLM-1998	2011	C. Madrid	FLORES-B	LMC	NEG	63	M	n.d	LOMBARDI	962/920	962 a / 920 j	1, 2, 3
IK-466	MHOM/ES/2011/LLM-2001	2011	C. Madrid	PONCE-P	LC	NEG	55	F	n.d	LOMBARDI	920	920 d	1, 2, 3
IK-467	MHOM/ES/2011/LLM-2039	2011	C. Madrid	TONI-M	LV	NEG	54	M	n.d	LOMBARDI	962/920	962 d / 920 b	1, 2, 3
IK-468	MHOM/ES/2011/LLM-2046	2011	C. Madrid	CARPIN-P	LC	NEG	69	F	n.d	LOMBARDI	920	920 a	1, 2, 3
IK-469	MHOM/ES/2011/LLM-2048	2011	C. Madrid	ILU-P	LC	NEG	57	F	n.d	LOMBARDI	920	920 a	1, 2, 3
IK-470	MHOM/ES/2011/LLM-1937	2011	C. Madrid	LOZA-M	LV	NEG	38	M	n.d	LOMBARDI	962/920	962 c / 920 j	1, 2
IK-471	MHOM/ES/2011/LLM-1954	2011	C. Madrid	CHEMA-M	LV	NEG	69	M	n.d	LOMBARDI	962	962 c	1, 2
IK-472	MHOM/ES/2011/LLM-2025	2011	C. Madrid	Muku-M	LV	NEG	8	M	n.d	LOMBARDI	962/920	962 c / 920 j	1, 2, 3
IK-473	MHOM/ES/2012/LLM-2096	2012	C. Madrid	RAY-M	LV	NEG	45	M	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-474	MHOM/ES/2012/LLM-2134	2012	C. Madrid	n.d	LV	POS	32	M	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-475	MHOM/ES/2012/LLM-2098	2012	C. Madrid	PAJE-M	LV	NEG	1	F	n.d	A	626	626b	1, 2, 3

Anexo 1 (continuación). Información clínico epidemiológicos de tipado molecular de los aislados de *Leishmania infantum* obtenidos a partir de casos humanos utilizados en este estudio (n=475).

Código Lab	Código OMS	Año	Origen	Cepa	Forma	VIH	Edad	Sexo	Zimodema	Tipo ITS	ST-K26	Subgrupo K26	Capítulo
IK-476	MHOM/ES/2012/LLM-2118	2012	C. Madrid	n.d	LC	NEG	53	M	n.d	A	626	626a	1, 2
IK-477	MHOM/ES/2012/LLM-2109	2012	C. Madrid	GIMENO-M	LV	NEG	60	M	n.d	LOMBARDI	962	962 d	1, 2, 3
IK-478	MHOM/ES/2012/LLM-2139	2012	C. Madrid	n.d	LV	NEG	47	M	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-479	MHOM/ES/2012/LLM-2059	2012	C. Madrid	TIN-P	LC	NEG	35	M	n.d	LOMBARDI	920	920 i	1, 2, 3
IK-480	MHOM/ES/2012/LLM-2063	2012	C. Madrid	ZILI-M	LV	NEG	67	M	n.d	LOMBARDI	920	920 h	1, 2, 3
IK-481	MHOM/ES/2012/LLM-2064	2012	C. Madrid	LOIMON-P	LC	NEG	45	M	n.d	LOMBARDI	920	n.d	1, 2, 3
IK-482	MHOM/ES/2012/LLM-2072	2012	C. Madrid	LEON-P	LC	NEG	53	F	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-483	MHOM/ES/2012/LLM-2074	2012	C. Madrid	TERO-P	LC	NEG	66	F	n.d	LOMBARDI	920	920 f	1, 2, 3
IK-484	MHOM/ES/2012/LLM-2076	2012	C. Madrid	VERDE-P	LC	NEG	32	M	n.d	LOMBARDI	920	920 e	1, 2, 3
IK-485	MHOM/ES/2012/LLM-2077	2012	C. Madrid	BANBA-P	LC	NEG	63	F	n.d	LOMBARDI	920	920 e	1, 2, 3
IK-486	MHOM/ES/2012/LLM-2079	2012	C. Madrid	MAPA-M	LV	POS	48	M	n.d	LOMBARDI	920	920 e	1, 2, 3
IK-487	MHOM/ES/2012/LLM-2097	2012	C. Madrid	BETE-M	LV	NEG	40	F	n.d	LOMBARDI	962/920	962 d / 920 b	1, 2, 3
IK-488	MHOM/ES/2012/LLM-2113	2012	C. Madrid	n.d	LV	NEG	37	F	n.d	LOMBARDI	920	920 a	1, 2, 3

Anexo 2. Cepas de *L. infantum* obtenidas de casos de LCan.

No. aislado	Código Lab.	Código OMS	Año	Origen	Cepa	Zimodema	Tipo ITS	K26-ST	Capítulo
1	CAN-1	MCAN/ES/2001/LLM-1006	2001	Madrid	MILT-3	MON-1	A	626	2, 3
2	CAN-2	MCAN/ES/2001/LLM-1014	2001	Madrid	MILT-4	MON-1	A	626	2, 3
3	CAN-3	MCAN/ES/2001/LLM-1040	2001	Madrid	MILT-7	MON-1	A	626	2, 3
4	CAN-4	MCAN/ES/2001/LLM-1051	2001	Madrid	MILT-12	MON-1	A	626	2, 3
5	CAN-5	MCAN/ES/2001/LLM-1052	2001	Madrid	MILT-10	MON-1	A	626	2, 3
6	CAN-6	MCAN/ES/2001/LLM-1070	2001	Madrid	MILT-28	MON-1	A	626	2, 3
7	CAN-7	MCAN/ES/2001/LLM-1073	2001	Madrid	MILT-30	MON-1	A	626	2, 3
8	CAN-8	MCAN/ES/2001/LLM-1077	2001	Madrid	MILT-26	MON-1	A	626	2, 3
9	CAN-9	MCAN/ES/2001/LLM-1084	2001	Madrid	MILT-31	MON-1	A	626	2, 3
10	CAN-10	MCAN/ES/2001/LLM-1099	2001	Madrid	MILT-36	MON-1	A	626	2, 3
11	CAN-11	MCAN/ES/2001/LLM-1107	2001	Madrid	MILT-35	MON-1	A	626	2, 3
12	CAN-12	MCAN/ES/2001/LLM-1037	2001	Madrid	MILT-6	MON-1	A	626	2, 3
13	CAN-13	MCAN/ES/2001/LLM-1038	2001	Madrid	MILT-5	MON-1	A	626	2, 3
14	CAN-14	MCAN/ES/2001/LLM-1068	2001	Madrid	MILT-29	MON-1	A	626	2, 3
15	CAN-15	MCAN/ES/2001/LLM-1102	2001	Madrid	MILT-41	n.d	A	626	2, 3
16	CAN-16	MCAN/ES/2002/LLM-1113	2002	Madrid	MILT-51	MON-1	A	626	2, 3
17	CAN-17	MCAN/ES/2002/LLM-1115	2002	Madrid	MILT-55	MON-1	A	626	2, 3
18	CAN-18	MCAN/ES/2002/LLM-1116	2002	Madrid	MILT-50	MON-1	A	626	2, 3
19	CAN-19	MCAN/ES/2002/LLM-1117	2002	Madrid	MILT-47	MON-1	A	626	2, 3
20	CAN-20	MCAN/ES/2002/LLM-1119	2002	Madrid	MILT-49	MON-1	A	626	2, 3
21	CAN-21	MCAN/ES/2002/LLM-1127	2002	Madrid	MILT-53	MON-1	A	626	2, 3
22	CAN-22	MCAN/ES/2002/LLM-1128	2002	Madrid	MILT-62	MON-1	A	626	2, 3
23	CAN-23	MCAN/ES/2002/LLM-1135	2002	Madrid	MILT-56	MON-1	A	626	2, 3
24	CAN-24	MCAN/ES/2002/LLM-1136	2002	Madrid	MILT-63	MON-1	A	626	2, 3
25	CAN-25	MCAN/ES/2002/LLM-1145	2002	Madrid	MILT-72	MON-1	A	626	2, 3
26	CAN-26	MCAN/ES/2002/LLM-1146	2002	Madrid	MILT-71	MON-1	A	626	2, 3
27	CAN-27	MCAN/ES/2002/LLM-1148	2002	Madrid	MILT-61	MON-1	A	626	2, 3
28	CAN-28	MCAN/ES/2002/LLM-1151	2002	Madrid	MILT-69	MON-1	A	626	2, 3
29	CAN-29	MCAN/ES/2002/LLM-1170	2002	Madrid	MILT-88	n.d	A	626	2, 3
30	CAN-30	MCAN/ES/2003/LLM-1225	2003	Madrid	MILT-97	n.d	A	626	2, 3
31	CAN-31	MCAN/ES/2003/LLM-1229	2003	Madrid	MILT-98	n.d	A	626	2, 3
32	CAN-32	MCAN/ES/2003/LLM-1234	2003	Madrid	MILT-96	n.d	A	626	2, 3
33	CAN-33	MCAN/ES/2003/LLM-1235	2003	Madrid	MILT-95	n.d	A	626	2, 3
34	CAN-34	MCAN/ES/2003/LLM-1246	2003	Madrid	MILT-106	n.d	A	626	2, 3
35	CAN-35	MCAN/ES/2003/LLM-1247	2003	Madrid	MILT-101	n.d	A	626	2, 3
36	CAN-36	MCAN/ES/2001/LLM-1088	2001	Valencia	MILT-13	MON-273	A	626	2, 3
37	CAN-37	MCAN/ES/2001/LLM-1089	2001	Valencia	MILT-32	MON-1	A	626	2, 3
38	CAN-38	MCAN/ES/2001/LLM-1053	2001	Cataluña	MILT-14	MON-1	A	626	2, 3
39	CAN-39	MCAN/ES/2001/LLM-1059	2001	Cataluña	MILT-22	MON-77	A	626	2, 3
40	CAN-40	MCAN/ES/2001/LLM-1069	2001	Cataluña	MILT-19	MON-1	A	626	2, 3
41	CAN-41	MCAN/ES/2001/LLM-1103	2001	Andalucía	MILT-37	MON-1	A	626	2, 3
42	CAN-42	MCAN/ES/2001/LLM-1057	2001	I. Baleares	MILT-20	MON-1	A	626	2, 3
43	CAN-43	MCAN/ES/2001/LLM-1098	2001	Andalucía	MILT-33	MON-1	A	626	2, 3
44	CAN-44	MCAN/ES/2002/LLM-1124	2002	Valencia	MILT-58	MON-1	A	626	2, 3
45	CAN-45	MCAN/ES/2002/LLM-1147	2002	Valencia	MILT-75	MON-1	A	626	2, 3
46	CAN-46	MCAN/ES/2002/LLM-1207	2002	Valencia	MILT-92	n.d	A	626	2, 3
47	CAN-47	MCAN/ES/2002/LLM-1133	2002	Andalucía	MILT-73	MON-1	A	626	2, 3
48	CAN-48	MCAN/ES/2002/LLM-1132	2002	Valencia	MILT-65	MON-1	A	626	2, 3
49	CAN-49	MCAN/ES/2002/LLM-1138	2002	Valencia	MILT-74	MON-253	A	626	2, 3
50	CAN-50	MCAN/ES/2002/LLM-1123	2002	Cataluña	MILT-64	MON-1	A	626	2, 3
51	CAN-51	MCAN/ES/2002/LLM-1174	2002	Cataluña	MILT-80	MON-1	A	626	2, 3
52	CAN-52	MCAN/ES/2002/LLM-1131	2002	Andalucía	MILT-66	MON-1	A	626	2, 3
53	CAN-53	MCAN/ES/2002/LLM-1172	2002	Andalucía	MILT-85	MON-1	A	626	2, 3
54	CAN-54	MCAN/ES/2005/LLM-1486	2005	Madrid	CUQUI-M	n.d	A	626	2
55	CAN-55	MCAN/ES/2008/LLM-1670	2008	Madrid	BRUST-II	n.d	A	626	2
56	CAN-56	MCAN/ES/2008/LLM-1668	2008	Madrid	AURA I	n.d	A	626	2
57	CAN-57	MCAN/ES/2010/LLM-1848	2010	Madrid	AGOR	n.d	A	626	2
58	CAN-58	MCAN/ES/2004/LLM-1338b	2004	Madrid	MILT-140	n.d	A	626	2
59	CAN-59	MCAN/ES/2004/LLM-1338b	2004	Madrid	MILT-141	n.d	A	626	2
60	CAN-60	MCAN/ES/2004/LLM-1343	2004	Madrid	MILT-147	n.d	A	626	2
61	CAN-61	MCAN/ES/2015/LLM-2276	2015	Madrid	DAMA	n.d	A	626	2
62	CAN-62	MCAN/ES/2015/LLM-2283	2015	Madrid	CASPER	n.d	A	626	2
63	CAN-63	MCAN/ES/2015/LLM-2281	2015	Madrid	GALGO	n.d	A	626	2
64	CAN-64	n.d	2015	Madrid	NIÑA	n.d	A	626	2
65	CAN-66	MCAN/ES/2015/LLM-2287	2015	Madrid	DUNA	n.d	A	626	2

Anexo 3. Detalle de las cepas de *L. infantum* obtenidas a partir de flebótomos infectados en la naturaleza durante la campaña de 2012.

No.	Código Lab	Código OMS	Fecha de aislamiento	Especie de flebótomo	Origen	Tipo de ITS	K26-ST	Capítulo
1	Ppe1	IPER/ES/2012/POL2FL1	23/07/2012	<i>P. perniciosus</i>	Madrid	LOMBARDI	920	2, 3
2	Ppe2	IPER/ES/2012/POL2FL5	24/08/2012	<i>P. perniciosus</i>	Madrid	LOMBARDI	920	
3	Ppe3	IPER/ES/2012/POL2FL7	24/09/2012	<i>P. perniciosus</i>	Madrid	LOMBARDI	920	
4	Ppe4	IPER/ES/2012/ATE1FL2	29/08/2012	<i>P. perniciosus</i>	Madrid	LOMBARDI	920	
5	Ppe5	IPER/ES/2012/ATE1FL4	21/09/2012	<i>P. perniciosus</i>	Madrid	LOMBARDI	920	
6	Ppe6	IPER/ES/2012/BOS1FL1	23/08/2012	<i>P. perniciosus</i>	Madrid	LOMBARDI	920	
7	Ppe7	IPER/ES/2012/BOS1FL2	21/09/2012	<i>P. perniciosus</i>	Madrid	LOMBARDI	920	
8	Ppe8	IPER/ES/2012/BOS2FL1	21/09/2012	<i>P. perniciosus</i>	Madrid	LOMBARDI	920	
9	Ppe9	IPER/ES/2012/JICFL1	19/07/2012	<i>P. perniciosus</i>	Madrid	LOMBARDI	920	
10	Ppe10	IPER/ES/2012/JICFL2	28/08/2012	<i>P. perniciosus</i>	Madrid	LOMBARDI	920	

Anexo 4. Cepas analizadas en la validación del sistema MLSA (*n*= 385). Se indica el origen geográfico en país y localidad si se dispone de la información, Código OMS de la cepa, zimodemas, hospedador y los resultados del tipado multilocus: el genotipo LST y el tipo de población (MLSA).

Origen	Localidad	Código	Referencia	Código OMS	Zimodema	Hospedador	LST	Población
Francia	n. d	L0075	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/78/LEM75	MON-1	Humano	01	A
Francia	n. d	L0189	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/80/LEM189	MON-11	Humano	01	A
Francia	n. d	L0538	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/84/LEM538	MON-34	Humano	01	A
Francia	n. d	L1355	El Baidouri et al., 2013	IPER/FR/88/LEM1355	MON-105	Flebótomo	01	A
Francia	n. d	L1393	El Baidouri et al., 2013	IPER/FR/88/LEM1393	MON-77	Flebótomo	01	A
Francia	n. d	L1424	El Baidouri et al., 2013	MCAN/FR/87/RM1	MON-108	Perro	01	A
Francia	n. d	L2479	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/88/LPMA74ER	MON-186	Humano	01	A
Francia	n. d	L4650	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/2003/LPN221	MON-1	Humano	01	A
Francia	n. d	L4749	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/2004/LPN228	MON-1	Humano	01	A
Francia	n. d	L4826	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/2004/LPN236	MON-1	Humano	01	A
Francia	n. d	L4838	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/2004/LPN235	MON-1	Humano	01	A
Francia	n. d	L4840	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/2004/LPN237	MON-1	Humano	01	A
Francia	n. d	L0356	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/82/LEM356	MON-33	Humano	02	C
Francia	n. d	L4929	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/2005/LPN253	MON-80	Humano	02	C
Francia	n. d	L3141	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/95/LEM3141	MON-28	Humano	03	C
Francia	n. d	L3538	El Baidouri et al., 2013	MHOM/FR/97/LPM 178a	MON-30	Humano	04	D
España	n. d	L0260	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/81/LEM260	MON-34	Humano	01	A
España	n. d	L0307	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/81/BCN1	MON-29	Humano	01	A
España	n. d	L1674	El Baidouri et al., 2013	MCAN/ES/89/BCN34	MON-11	Perro	01	A
España	n. d	L2205	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/90/BCN61	MON-28	Humano	01	A
España	n. d	L2298	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/91/LEM2298	MON-183	Humano	01	A
España	n. d	L3338	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/97/LGE1	MON-1	Humano	01	A
España	n. d	L3637	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/97/LLM719	MON-253	Humano	01	A
España	n. d	L4224	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/2000/LLM938	MON-282	Humano	01	A
España	n. d	L4228	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/97/LLM615	MON-285	Humano	01	A
España	n. d	L3588	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/98/DPPE28	MON-24	Humano	05	C
España	n. d	L5110	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/96/LLM-558	MON-302	Humano	05	C
España	n. d	L2893	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/88/LLM175	MON-198	Humano	02	C
España	n. d	L0935	El Baidouri et al., 2013	MCAN/ES/86/LEM935	MON-77	Perro	06	A
España	n. d	L1560	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/89/BCN32	MON-33	Humano	07	C
España	n. d	L2894	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/92/LLM373	MON-199	Humano	08	A
España	n. d	L4223	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/95/LLM480	MON-228	Humano	09	C
España	n. d	L4227	El Baidouri et al., 2013	MHOM/ES/99/LLM855	MON-284	Humano	10	C
Portugal	n. d	L2844	El Baidouri et al., 2013	MHOM/PT/94/IMT202	MON-29	Humano	01	A
Portugal	n. d	L3519	El Baidouri et al., 2013	MHOM/PT/98/IMT238	MON-80	Humano	01	A
Portugal	n. d	L3940	El Baidouri et al., 2013	MCAN/PT/99/BOBI	MON-98	Perro	01	A
Portugal	n. d	L4610	El Baidouri et al., 2013	MHOM/PT/2001/IMT266B	MON-1	Humano	01	A
Portugal	n. d	L1764	El Baidouri et al., 2013	IARI/PT/89/IMT171	MON-24	Flebótomo	11	C
Portugal	n. d	L3976	El Baidouri et al., 2013	MHOM/PT/2000/IMT261	MON-1	Humano	12	C
Reino Unido	n. d	L3357	El Baidouri et al., 2013	MCAN/ /..LV755	MON-1	Perro	01	A
Alemania	n. d	L3546	El Baidouri et al., 2013	MHOM/DL/98/LUB1	MON-1	Humano	01	A
Italia	n. d	L0236	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/79/ISS7	MON-27	Humano	01	A
Italia	n. d	L0895	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/86/ISS218	MON-72	Humano	01	A
Italia	n. d	L2791	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/93/ISS833	MON-190	Humano	01	A
Italia	n. d	L3346	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/97/LPN149	MON-1	Humano	01	A
Italia	n. d	L1733	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/85/ISS175	MON-111	Humano	13	C
Italia	n. d	L2180	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/90/ISS510	MON-136	Humano	14	C
Italia	n. d	L2481	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/91/ISS666	MON-185	Humano	15	C
Italia	n. d	L2793	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/93/ISS800	MON-188	Humano	16	C
Italia	n. d	L2794	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/93/ISS822	MON-201	Humano	17	C
Italia	n. d	L2795	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/92/ISS683	MON-187	Humano	18	C
Italia	n. d	L3437	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IT/95/GIIPcos	MON-29	Humano	19	D
Malta	n. d	L1043	El Baidouri et al., 2013	MHOM/MT/85/BUCK	MON-78	Humano	20	C
Grecia	n. d	L2289	El Baidouri et al., 2013	MHOM/GR/90/LA1037	MON-1	Humano	01	A
Grecia	n. d	L0659	El Baidouri et al., 2013	MHOM/GR/00/LEM659	MON-80	Humano	21	C
Grecia	n. d	L4701	El Baidouri et al., 2013	MHOM/GR/2003/GH15	MON-98	Humano	01	A
Albania	n. d	L3895	El Baidouri et al., 2013	MCAN/AL/98/C78L574a	MON-1	Perro	01	A
Albania	n. d	L3962	El Baidouri et al., 2013	MHOM/AL/2000/516LEZH	MON-1	Humano	01	A
Turquía	n. d	L2813	El Baidouri et al., 2013	MHOM/TR/94/LPN101	MON-1	Humano	01	A
Siria	n. d	L2109	El Baidouri et al., 2013	MCAN/SY/90/LEM2109	MON-1	Perro	01	A
Israel	n. d	L3386	El Baidouri et al., 2013	MCAN/IL/97/LRC-L720	MON-1	Perro	01	A
Israel	n. d	L5425	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IL/2006/LRC-L1296	MON-1	Humano	01	A
Israel	n. d	L5426	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IL/2006/LRC-L1300	MON-1	Humano	01	A
Israel	n. d	L5427	El Baidouri et al., 2013	MHOM/IL/2007/LRC-L1303	MON-1	Humano	01	A
Irán	n. d	L3161	El Baidouri et al., 2013	MCAN/IR/94/MOHEBL1	MON-1	Perro	01	A
Uzbekistán	n. d	L5542	El Baidouri et al., 2013	MCAN/UZ/2007/LRC-L1313	MON-1	Perro	01	A
China	n. d	L0666	El Baidouri et al., 2013	MNYT/CN/80/RACOONDOG	MON-34	Roedor	01	A

Anexo 4. Continuación. Cepas analizadas en la validación del sistema MLSA (*n*= 385). Se indica el origen geográfico en país y localidad si se dispone de la información, Código OMS de la cepa, zimodemas, hospedador y los resultados del tipado multilocus: el genotipo LST y el tipo de población (MLSA).

Origen	Localidad	Código	Referencia	Código OMS	Zimodema	Hospedador	LST	Población
Marruecos	n. d	L2629	El Baidouri et al.,2013	MCAN/MA/93/LEM2629	MON-1	Perro	01	A
Marruecos	n. d	L4616	El Baidouri et al.,2013	MHOM/MA/2003/TIM10	MON-29	Humano	22	D
Marruecos	n. d	L2455	El Baidouri et al.,2013	MHOM/MA/92/LEM2455	MON-24	Humano	23	D
Argelia	n. d	L0461	El Baidouri et al.,2013	MHOM/DZ/83/LIPA120	MON-34	Humano	01	A
Argelia	n. d	L1671	El Baidouri et al.,2013	MCAN/DZ/89/LEM1671	MON-77	Perro	01	A
Argelia	n. d	L5695	El Baidouri et al.,2013	MCAN/DZ/2008/ENV48	MON-281	Perro	01	A
Argelia	n. d	L0417	El Baidouri et al.,2013	MHOM/DZ/82/LIPA59	MON-24	Humano	24	D
Argelia	n. d	L0425	El Baidouri et al.,2013	MHOM/DZ/83/LEM425	MON-80	Humano	25	C
Argelia	n. d	L2506	El Baidouri et al.,2013	MHOM/DZ/92/CRE21	MON-78	Humano	26	C
Argelia	n. d	L2884	El Baidouri et al.,2013	MHOM/DZ/94/CRE64	MON-33	Humano	27	C
Túnez	n. d	L3675	El Baidouri et al.,2013	MHOM/TN/98/20MO	MON-1	Humano	01	A
Túnez	n. d	L3968	El Baidouri et al.,2013	MHOM/TN/99/105	MON-80	Humano	28	C
Túnez	n. d	L4392	El Baidouri et al.,2013	MHOM/TN/2002/LC38	MON-24	Humano	29	D
Egipto	n. d	L1208	El Baidouri et al.,2013	MHOM/EG/87/RTC2	MON-98	Humano	01	A
Yemen	n. d	L1240	El Baidouri et al.,2013	MHOM/YE/88/LEM1240	MON-1	Humano	01	A
Senegal	n. d	L1315	El Baidouri et al.,2013	MCAN/SN/88/LEM1315	MON-1	Perro	01	A
RCAfrica	n. d	L0622	El Baidouri et al.,2013	MHOM/CF/00/CONJUGO	MON-1	Humano	01	A
Sudán	n. d	L0494	El Baidouri et al.,2013	MHOM/SD/82/GILANI	MON-30	Humano	30	D
Sudán	n. d	L0890	El Baidouri et al.,2013	MHOM/SD/66/L46	MON-30	Humano	31	D
Sudán	n. d	L1153	El Baidouri et al.,2013	MHOM/SD/62/3S	MON-81	Humano	32	D
Sudán	n. d	L1154	El Baidouri et al.,2013	MHOM/SD/00/DH177	MON-81	Humano	33	D
Sudán	n. d	L3941	El Baidouri et al.,2013	MCAN/SD/2000/LEM3941	MON-278	Perro	34	D
Sudán	n. d	L3988	El Baidouri et al.,2013	MCAN/SD/2000/LEM3988	MON-267	Perro	35	D
España	n. d	JPC	En este trabajo	MCAN/ES/98/LLM-724	MON-1	Perro	01	A
España	n. d	PB75	En este trabajo	MHOM/FR/78/LEM-75	MON-1	Humano	01	A
España	Cataluña	IK-1	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-906	MON-1	Humano	01	A
España	Andalucía	IK-2	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-900	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-3	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-896	MON-1	Humano	01	A
España	Cataluña	IK-4	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-885	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-5	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-883	MON-1	Humano	01	A
España	Cataluña	IK-6	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-878	MON-1	Humano	01	A
España	Cataluña	IK-7	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-860	MON-1	Humano	01	A
España	Cataluña	IK-8	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-853	MON-1	Humano	01	A
España	C-La Mancha	IK-9	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-851	MON-1	Humano	01	A
España	I. Baleares	IK-10	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-829	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-11	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-826	MON-1	Humano	01	A
España	I. Baleares	IK-12	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-821	MON-1	Humano	01	A
España	Valencia	IK-13	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-823	MON-1	Humano	01	A
España	Cataluña	IK-14	En este trabajo	MHOM/ES/1998/LLM-818	MON-1	Humano	01	A
España	I. Baleares	IK-15	En este trabajo	MHOM/ES/1998/LLM-817	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-16	En este trabajo	MHOM/ES/1998/LLM-789	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-32	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-690	MON-1	Humano	08	A
España	C. Madrid	IK-35	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-674	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-36	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-465	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-37	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-666	MON-1	Humano	36	A
España	C. Madrid	IK-38	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-665	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-39	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-623	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-41	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-607	MON-1	Humano	05	C
España	C. Madrid	IK-43	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-548	MON-1	Humano	37	A
España	C. Madrid	IK-44	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-553	MON-1	Humano	38	A
España	I. Baleares	IK-46	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-527	MON-1	Humano	39	B
España	C. Madrid	IK-47	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-556	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-48	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-554	MON-1	Humano	38	A
España	C. Madrid	IK-49	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-551	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-50	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-549	MON-1	Humano	40	A
España	I. Baleares	IK-51	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-535	MON-1	Humano	41	B
España	Valencia	IK-52	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-523	MON-1	Humano	42	B
España	C-León	IK-54	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-484	MON-1	Humano	43	B
España	C. Madrid	IK-55	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-482	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-56	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-478	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-57	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-470	MON-1	Humano	44	B
España	C. Madrid	IK-58	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-468	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-60	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-464	MON-1	Humano	45	A
España	C-León	IK-61	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-452	MON-1	Humano	46	B
España	C. Madrid	IK-62	En este trabajo	MHOM/ES/1994/LLM-410	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-63	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-335	MON-1	Humano	47	B

Anexo 4. Continuación. Cepas analizadas en la validación del sistema MLSA (*n*= 385). Se indica el origen geográfico en país y localidad si se dispone de la información, Código OMS de la cepa, zimodemas, hospedador y los resultados del tipado multilocus: el genotipo LST y el tipo de población (MLSA).

Origen	Localidad	Código	Referencia	Código OMS	Zimodema	Hospedador	LST	Población
España	C. Madrid	IK-64	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-323	MON-1	Humano	48	B
España	I. Baleares	IK-65	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-320	MON-1	Humano	49	A
España	C. Madrid	IK-66	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-315	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-67	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-306	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-68	En este trabajo	MHOM/ES/1991/LLM-328	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-69	En este trabajo	MHOM/ES/1991/LLM-326	MON-1	Humano	01	A
España	C-La Mancha	IK-70	En este trabajo	MHOM/ES/1988/LLM-190	MON-1	Humano	50	B
España	C. Madrid	IK-71	En este trabajo	MHOM/ES/1988/LLM-180	MON-1	Humano	01	A
España	C-La Mancha	IK-73	En este trabajo	MHOM/ES/1987/LLM-150	MON-1	Humano	51	B
España	C. Madrid	IK-74	En este trabajo	MHOM/ES/2005/LLM-1523	MON-1	Humano	52	A
España	C. Madrid	IK-75	En este trabajo	MHOM/ES/2005/LLM-1524	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-76	En este trabajo	MHOM/ES/2005/LLM-1492	MON-1	Humano	01	A
España	Cataluña	IK-77	En este trabajo	MHOM/ES/2005/LLM-1476	MON-1	Humano	53	B
España	C. Madrid	IK-78	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1461	MON-1	Humano	52	A
España	C. Madrid	IK-81	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1405	MON-1	Humano	01	A
España	I. Baleares	IK-82	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1404	MON-1	Humano	54	B
España	C. Madrid	IK-83	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1377	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-84	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1372	MON-1	Humano	01	A
España	Cataluña	IK-89	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1358	MON-1	Humano	51	B
España	C. Madrid	IK-91	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1347	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-92	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1337	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-93	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1327	MON-1	Humano	01	A
España	I. Baleares	IK-94	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1310	MON-1	Humano	55	B
España	C. Madrid	IK-96	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1304	MON-1	Humano	56	B
España	C. Madrid	IK-97	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1262	MON-1	Humano	57	A
España	Extremadura	IK-98	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1261	MON-1	Humano	58	B
España	C. Madrid	IK-99	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1258	MON-1	Humano	2	C
España	Cataluña	IK-100	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1253	MON-1	Humano	51	B
España	C. Madrid	IK-103	En este trabajo	MHOM/ES/2002/LLM-1220	MON-1	Humano	01	A
España	I. Baleares	IK-104	En este trabajo	MHOM/ES/2002/LLM-1189	MON-1	Humano	59	B
España	C. Madrid	IK-105	En este trabajo	MHOM/ES/2002/LLM-1181	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-106	En este trabajo	MHOM/ES/2002/LLM-1166	MON-1	Humano	01	A
España	Andalucía	IK-107	En este trabajo	MHOM/ES/2002/LLM-1163	MON-1	Humano	60	B
España	C. Madrid	IK-110	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-984	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-111	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-983	MON-1	Humano	57	A
España	C. Madrid	IK-112	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-980	MON-1	Humano	08	A
España	Andalucía	IK-113	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-1093	MON-1	Humano	61	B
España	I. Baleares	IK-114	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-1049	MON-1	Humano	51	B
España	I. Baleares	IK-115	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-1048	MON-1	Humano	62	B
España	Cataluña	IK-116	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-964	MON-1	Humano	51	B
España	Cataluña	IK-118	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-960	MON-1	Humano	63	B
España	C. Madrid	IK-120	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-936	MON-1	Humano	5	C
España	C. Madrid	IK-122	En este trabajo	MHOM/ES/1993/LLM-404	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-123	En este trabajo	MHOM/ES/1990/LLM-195	MON-1	Humano	01	A
España	C-La Mancha	IK-124	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-333	MON-1	Humano	64	B
España	C. Madrid	IK-125	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-450	MON-1	Humano	65	C
España	C. Madrid	IK-126	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-442	MON-1	Humano	65	C
España	C. Madrid	IK-127	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-339	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-128	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-312	MON-1	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-129	En este trabajo	MHOM/ES/1991/LLM-301	MON-24	Humano	65	C
España	C. Madrid	IK-130	En este trabajo	MHOM/ES/1991/LLM-317	MON-24	Humano	65	C
España	C-León	IK-131	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-341	MON-24	Humano	66	B
España	C. Madrid	IK-132	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-441	MON-24	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-133	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-443	MON-24	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-134	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-456	MON-24	Humano	67	C
España	C. Madrid	IK-135	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-465	MON-24	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-136	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-485	MON-24	Humano	65	C
España	C. Madrid	IK-137	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-529	MON-24	Humano	68	C
España	C. Madrid	IK-138	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-569	MON-24	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-139	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-575	MON-24	Humano	69	C
España	C. Madrid	IK-140	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-576	MON-24	Humano	70	C
España	C. Madrid	IK-141	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-587	MON-24	Humano	70	C
España	C. Madrid	IK-142	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-598	MON-24	Humano	02	C
España	Galicia	IK-143	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-613	MON-24	Humano	71	B
España	C. Madrid	IK-145	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-707	MON-24	Humano	70	C
España	C. Madrid	IK-146	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-711	MON-24	Humano	01	A

Anexo 4. Continuación. Cepas analizadas en la validación del sistema MLSA (*n*= 385). Se indica el origen geográfico en país y localidad si se dispone de la información, Código OMS de la cepa, zimodemas, hospedador y los resultados del tipado multilocus: el genotipo LST y el tipo de población (MLSA).

Origen	Localidad	Código	Referencia	Código OMS	Zimodema	Hospedador	LST	Población
España	C. Madrid	IK-147	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-713	MON-24	Humano	02	C
España	C. Madrid	IK-149	En este trabajo	MHOM/ES/1998/LLM-730	MON-24	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-151	En este trabajo	MHOM/ES/1998/LLM-779	MON-24	Humano	72	B
España	C. Madrid	IK-154	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-845	MON-24	Humano	01	A
España	C-La Mancha	IK-158	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-864	MON-24	Humano	68	C
España	Galicia	IK-160	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-946	MON-24	Humano	73	C
España	C. Madrid	IK-161	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-957	MON-24	Humano	65	C
España	C. Madrid	IK-163	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-1027	MON-24	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-164	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-1032	MON-24	Humano	65	C
España	C. Madrid	IK-165	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-1065	MON-24	Humano	65	C
España	C. Madrid	IK-166	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-1078	MON-24	Humano	01	A
España	C-La Mancha	IK-167	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-1105	MON-24	Humano	02	C
España	C. Madrid	IK-168	En este trabajo	MHOM/ES/2001/LLM-982	MON-24	Humano	74	C
España	C. Madrid	IK-170	En este trabajo	MHOM/ES/2002/LLM-1177	MON-24	Humano	75	C
España	C-La Mancha	IK-172	En este trabajo	MHOM/ES/2002/LLM-1211	MON-24	Humano	76	C
España	C-La Mancha	IK-173	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1303	MON-24	Humano	77	C
España	C. Madrid	IK-174	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1305	MON-24	Humano	65	C
España	C. Madrid	IK-175	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1346	MON-24	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-176	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1367	MON-24	Humano	01	A
España	C-La Mancha	IK-178	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1402	MON-24	Humano	78	B
España	C. Madrid	IK-179	En este trabajo	MHOM/ES/2005/LLM-1475	MON-24	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-180	En este trabajo	MHOM/ES/2005/LLM-1478	MON-24	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-182	En este trabajo	MHOM/ES/2005/LLM-1525	MON-24	Humano	70	C
España	C. Madrid	IK-183	En este trabajo	MHOM/ES/2005/LLM-1526	MON-183	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-184	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-334	MON-183	Humano	01	A
España	Andalucía	IK-185	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-336	MON-183	Humano	79	B
España	Andalucía	IK-186	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-444	MON-183	Humano	80	C
España	C. Madrid	IK-188	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-667	MON-183	Humano	02	C
España	Andalucía	IK-190	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-942	MON-183	Humano	81	C
España	C. Madrid	IK-191	En este trabajo	MHOM/ES/2002/LLM-1208	MON-183	Humano	2	C
España	Andalucía	IK-193	En este trabajo	MHOM/ES/2004/LLM-1376	MON-253	Humano	82	C
España	C. Madrid	IK-194	En este trabajo	MHOM/ES/1995/LLM-455	MON-253	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-195	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-580	MON-253	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-196	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-583	MON-253	Humano	01	A
España	Cataluña	IK-201	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-927	MON-253	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-202	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1230	MON-28	Humano	01	A
España	Valencia	IK-204	En este trabajo	MHOM/ES/1992/LLM-370	MON-28	Humano	83	C
España	C. Madrid	IK-205	En este trabajo	MHOM/ES/1998/LLM-738	MON-29	Humano	78	B
España	Extremadura	IK-206	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-953	MON-28	Humano	84	C
España	Valencia	IK-209	En este trabajo	MHOM/ES/1991/LLM-309	MON-29	Humano	85	B
España	C. Madrid	IK-211	En este trabajo	MHOM/ES/1991/LLM-311	MON-29	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-213	En este trabajo	MHOM/ES/1998/LLM-727	MON-33	Humano	05	C
España	C-La Mancha	IK-214	En este trabajo	MHOM/ES/1998/LLM-778	MON-29	Humano	86	B
España	I. Baleares	IK-215	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-949	MON-29	Humano	02	C
España	C. Madrid	IK-219	En este trabajo	MHOM/ES/1986/LLM-116	MON-33	Humano	02	C
España	Andalucía	IK-225	En este trabajo	MHOM/ES/2005/LLM-1518	MON-34	Humano	01	A
España	I. Baleares	IK-231	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-969	MON-80	Humano	87	C
España	Andalucía	IK-246	En este trabajo	MHOM/ES/1997/LLM-630	MON-283	Humano	01	A
España	C-La Mancha	IK-257	En este trabajo	MHOM/ES/2002/LLM-1110	MON-34	Humano	01	A
España	I. Baleares	IK-258	En este trabajo	MHOM/ES/2002/LLM-1167	MON-34	Humano	88	B
España	Extremadura	IK-263	En este trabajo	MHOM/ES/2003/LLM-1316	MON-34	Humano	89	B
España	Andalucía	IK-268	En este trabajo	MHOM/ES/1999/LLM-857	MON-302	Humano	01	A
España	Extremadura	IK-270	En este trabajo	MHOM/ES/2000/LLM-971	MON-284	Humano	44	B
España	Extremadura	IK-273	En este trabajo	MHOM/ES/1996/LLM-564	n. d	Humano	90	C
España	C. Madrid	IK-416	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1665	n. d	Humano	91	A
España	C. Madrid	IK-417	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1695	n. d	Humano	92	A
España	C. Madrid	IK-418	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1643	n. d	Humano	93	C
España	C. Madrid	IK-419	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1657	n. d	Humano	94	C
España	C. Madrid	IK-420	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1676	n. d	Humano	95	A
España	C. Madrid	IK-421	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1667	n. d	Humano	96	C
España	C. Madrid	IK-422	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1644	n. d	Humano	97	C
España	C. Madrid	IK-423	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1646	n. d	Humano	97	C
España	C. Madrid	IK-424	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1653	n. d	Humano	98	A
España	C. Madrid	IK-425	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1681	n. d	Humano	99	A
España	C. Madrid	IK-426	En este trabajo	MHOM/ES/2008/LLM-1648	n. d	Humano	100	C
España	C. Madrid	IK-427	En este trabajo	MHOM/ES/2009/LLM-1707	n. d	Humano	01	A

Anexo 4. Continuación. Cepas analizadas en la validación del sistema MLSA (*n*= 385). Se indica el origen geográfico en país y localidad si se dispone de la información, Código OMS de la cepa, zimodemas, hospedador y los resultados del tipado multilocus: el genotipo LST y el tipo de población (MLSA).

Origen	Localidad	Código	Referencia	Código OMS	Zimodema	Hospedador	LST	Población
España	C. Madrid	IK-428	En este trabajo	MHOM/ES/2009/LLM-1725	n. d	Humano	101	A
España	C. Madrid	IK-429	En este trabajo	MHOM/ES/2009/LLM-1734	n. d	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-430	En este trabajo	MHOM/ES/2009/LLM-1750	n. d	Humano	70	C
España	C. Madrid	IK-431	En este trabajo	MHOM/ES/2009/LLM-1729	n. d	Humano	102	C
España	C. Madrid	IK-432	En este trabajo	MHOM/ES/2009/LLM-1756	n. d	Humano	01	A
España	C. Madrid	IK-433	En este trabajo	MHOM/ES/2009/LLM-1790	n. d	Humano	103	C
España	C. Madrid	IK-434	En este trabajo	MHOM/ES/2009/LLM-1703	n. d	Humano	104	C
España	C. Madrid	IK-435	En este trabajo	MHOM/ES/2009/LLM-1712	n. d	Humano	105	A
España	C. Madrid	IK-436	En este trabajo	MHOM/ES/2009/LLM-1714	n. d	Humano	97	C
España	C. Madrid	IK-437	En este trabajo	MHOM/ES/2010/LLM-1896	n. d	Humano	97	C
España	C. Madrid	IK-438	En este trabajo	MHOM/ES/2010/LLM-1920	n. d	Humano	106	A
España	C. Madrid	IK-439	En este trabajo	MHOM/ES/2010/LLM-1873	n. d	Humano	107	A
España	C. Madrid	IK-440	En este trabajo	MHOM/ES/2010/LLM-1858	n. d	Humano	108	A
España	C. Madrid	IK-441	En este trabajo	MHOM/ES/2010/LLM-1859	n. d	Humano	109	A
España	C. Madrid	IK-442	En este trabajo	MHOM/ES/2010/LLM-1888	n. d	Humano	110	C
España	C. Madrid	IK-443	En este trabajo	MHOM/ES/2010/LLM-1854	n. d	Humano	111	A
España	C. Madrid	IK-444	En este trabajo	MHOM/ES/2010/LLM-1918	n. d	Humano	112	C
España	C. Madrid	IK-445	En este trabajo	MHOM/ES/2010/LLM-1886	n. d	Humano	113	C
España	C. Madrid	IK-446	En este trabajo	MHOM/ES/2010/LLM-1899	n. d	Humano	114	C
España	C. Madrid	IK-447	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2027	n. d	Humano	115	C
España	C. Madrid	IK-448	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2032	n. d	Humano	116	A
España	C. Madrid	IK-449	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2005	n. d	Humano	117	A
España	C. Madrid	IK-450	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2051	n. d	Humano	118	A
España	C. Madrid	IK-451	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1948	n. d	Humano	119	A
España	C. Madrid	IK-452	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2033	n. d	Humano	120	A
España	C. Madrid	IK-453	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2047	n. d	Humano	48	B
España	C. Madrid	IK-454	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1946	n. d	Humano	121	A
España	C. Madrid	IK-455	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2018	n. d	Humano	122	A
España	C. Madrid	IK-456	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2037	n. d	Humano	123	A
España	C. Madrid	IK-457	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1988	n. d	Humano	124	C
España	C. Madrid	IK-458	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1964	n. d	Humano	125	A
España	C. Madrid	IK-459	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1929	n. d	Humano	126	A
España	C. Madrid	IK-460	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1956	n. d	Humano	127	A
España	C. Madrid	IK-461	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1974	n. d	Humano	128	C
España	C. Madrid	IK-462	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1982	n. d	Humano	129	A
España	C. Madrid	IK-463	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1983	n. d	Humano	130	C
España	C. Madrid	IK-464	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1984	n. d	Humano	131	C
España	C. Madrid	IK-465	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-1998	n. d	Humano	132	A
España	C. Madrid	IK-466	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2001	n. d	Humano	133	A
España	C. Madrid	IK-467	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2039	n. d	Humano	134	C
España	C. Madrid	IK-468	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2046	n. d	Humano	135	A
España	C. Madrid	IK-469	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2048	n. d	Humano	136	A
España	C. Madrid	IK-472	En este trabajo	MHOM/ES/2011/LLM-2025	n. d	Humano	137	C
España	C. Madrid	IK-473	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2096	n. d	Humano	138	A
España	C. Madrid	IK-474	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2134	n. d	Humano	139	A
España	C. Madrid	IK-475	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2098	n. d	Humano	140	A
España	C. Madrid	IK-477	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2109	n. d	Humano	141	A
España	C. Madrid	IK-478	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2139	n. d	Humano	142	A
España	C. Madrid	IK-479	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2059	n. d	Humano	143	C
España	C. Madrid	IK-480	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2063	n. d	Humano	144	A
España	C. Madrid	IK-481	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2064	n. d	Humano	129	A
España	C. Madrid	IK-482	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2072	n. d	Humano	145	C
España	C. Madrid	IK-483	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2074	n. d	Humano	146	A
España	C. Madrid	IK-484	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2076	n. d	Humano	147	A
España	C. Madrid	IK-485	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2077	n. d	Humano	148	A
España	C. Madrid	IK-486	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2079	n. d	Humano	149	A
España	C. Madrid	IK-487	En este trabajo	MHOM/ES/2012/LLM-2097	n. d	Humano	150	A
España	C. Madrid	CAN-1	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1006	MON-1	Perro	151	A
España	C. Madrid	CAN-2	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1014	MON-1	Perro	152	A
España	C. Madrid	CAN-3	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1040	MON-1	Perro	153	A
España	C. Madrid	CAN-4	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1051	MON-1	Perro	154	A
España	C. Madrid	CAN-5	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1052	MON-1	Perro	154	A
España	C. Madrid	CAN-6	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1070	MON-1	Perro	155	A
España	C. Madrid	CAN-7	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1073	MON-1	Perro	156	A
España	C. Madrid	CAN-8	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1077	MON-1	Perro	157	A
España	C. Madrid	CAN-9	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1084	MON-1	Perro	157	A

Anexo 4. Continuación. Cepas analizadas en la validación del sistema MLSA (*n*= 385). Se indica el origen geográfico en país y localidad si se dispone de la información, Código OMS de la cepa, zimodemas, hospedador y los resultados del tipado multilocus: el genotipo LST y el tipo de población (MLSA).

Origen cepa	Localidad	Código	Referencia	Código OMS	Zimodema	Hospedador	LST	Población
España	C. Madrid	CAN-10	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1099	MON-1	Perro	158	A
España	C. Madrid	CAN-11	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1107	MON-1	Perro	159	A
España	C. Madrid	CAN-12	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1037	MON-1	Perro	160	A
España	C. Madrid	CAN-13	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1038	MON-1	Perro	161	A
España	C. Madrid	CAN-14	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1068	n. d	Perro	154	A
España	C. Madrid	CAN-15	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1102	MON-1	Perro	162	A
España	C. Madrid	CAN-16	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1113	MON-1	Perro	163	A
España	C. Madrid	CAN-17	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1115	MON-1	Perro	164	A
España	C. Madrid	CAN-18	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1116	MON-1	Perro	158	A
España	C. Madrid	CAN-19	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1117	MON-1	Perro	158	A
España	C. Madrid	CAN-20	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1119	MON-1	Perro	158	A
España	C. Madrid	CAN-21	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1127	MON-1	Perro	165	A
España	C. Madrid	CAN-22	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1128	MON-1	Perro	166	A
España	C. Madrid	CAN-23	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1135	MON-1	Perro	158	A
España	C. Madrid	CAN-24	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1136	MON-1	Perro	167	A
España	C. Madrid	CAN-25	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1145	MON-1	Perro	166	A
España	C. Madrid	CAN-26	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1146	MON-1	Perro	166	A
España	C. Madrid	CAN-27	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1148	MON-1	Perro	166	A
España	C. Madrid	CAN-28	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1151	MON-1	Perro	168	A
España	C. Madrid	CAN-29	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1170	n. d	Perro	166	A
España	C. Madrid	CAN-30	En este trabajo	MCAN/ES/2003/LLM-1225	n. d	Perro	167	A
España	C. Madrid	CAN-31	En este trabajo	MCAN/ES/2003/LLM-1229	n. d	Perro	167	A
España	C. Madrid	CAN-32	En este trabajo	MCAN/ES/2003/LLM-1234	n. d	Perro	166	A
España	C. Madrid	CAN-33	En este trabajo	MCAN/ES/2003/LLM-1235	n. d	Perro	166	A
España	C. Madrid	CAN-34	En este trabajo	MCAN/ES/2003/LLM-1246	n. d	Perro	169	A
España	C. Madrid	CAN-35	En este trabajo	MCAN/ES/2003/LLM-1247	MON-273	Perro	166	A
España	Valencia	CAN-36	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1088	MON-1	Perro	01	A
España	Valencia	CAN-37	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1089	MON-1	Perro	170	A
España	Cataluña	CAN-38	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1053	MON-77	Perro	01	A
España	Cataluña	CAN-39	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1059	MON-1	Perro	171	A
España	Cataluña	CAN-40	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1069	MON-1	Perro	172	A
España	Andalucía	CAN-41	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1103	MON-1	Perro	170	A
España	I. Baleares	CAN-42	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1057	MON-1	Perro	61	B
España	Andalucía	CAN-43	En este trabajo	MCAN/ES/2001/LLM-1098	MON-1	Perro	170	A
España	Valencia	CAN-44	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1124	MON-1	Perro	49	A
España	Valencia	CAN-45	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1147	n. d	Perro	172	A
España	Valencia	CAN-46	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1207	MON-1	Perro	01	A
España	Andalucía	CAN-47	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1133	MON-1	Perro	01	A
España	Valencia	CAN-48	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1132	MON-253	Perro	01	A
España	Valencia	CAN-49	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1138	MON-1	Perro	01	A
España	Cataluña	CAN-50	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1123	MON-1	Perro	172	A
España	Cataluña	CAN-51	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1174	MON-1	Perro	01	A
España	Andalucía	CAN-52	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1131	MON-1	Perro	01	A
España	Andalucía	CAN-53	En este trabajo	MCAN/ES/2002/LLM-1172	n. d	Perro	01	A
España	C. Madrid	FLEB-1	En este trabajo	IPER/ES/2012/POL2FL1	n. d	Flebótomo	02	C
España	C. Madrid	FLEB-2	En este trabajo	IPER/ES/2012/POL2FL5	n. d	Flebótomo	173	C
España	C. Madrid	FLEB-3	En este trabajo	IPER/ES/2012/POL2FL7	n. d	Flebótomo	01	A
España	C. Madrid	FLEB-4	En este trabajo	IPER/ES/2012/ATE1FL2	n. d	Flebótomo	174	C
España	C. Madrid	FLEB-5	En este trabajo	IPER/ES/2012/ATE1FL4	n. d	Flebótomo	2	C
España	C. Madrid	FLEB-6	En este trabajo	IPER/ES/2012/BOS1FL1	n. d	Flebótomo	01	A
España	C. Madrid	FLEB-7	En este trabajo	IPER/ES/2012/BOS1FL2	n. d	Flebótomo	01	A
España	C. Madrid	FLEB-8	En este trabajo	IPER/ES/2012/BOS2FL1	n. d	Flebótomo	175	C
España	C. Madrid	FLEB-9	En este trabajo	IPER/ES/2012/JICFL1	n. d	Flebótomo	2	C
España	C. Madrid	FLEB-10	En este trabajo	IPER/ES/2012/JICFL2	n. d	Flebótomo	01	A

Anexo 5. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos en el Capítulo 4.

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Archivel, Murcia	KP685413	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Archivel, Murcia	KP685414	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Archivel, Murcia	KP685415	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Archivel, Murcia	KP685416	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Archivel, Murcia	KP685417	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Archivel, Murcia	KP685418	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Archivel, Murcia	KP685419	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Archivel, Murcia	KP685420	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Cañamero, Cáceres	KP685421	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Cañamero, Cáceres	KP685422	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Cañamero, Cáceres	KP685423	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685424	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685425	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685426	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685427	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685428	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685429	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685430	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685431	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685432	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685433	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP685434	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685435	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685436	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685437	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685438	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685439	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685440	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685441	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685442	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685443	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685444	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685445	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685446	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685447	En este trabajo	481	26, 104, 351	I

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685448	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685449	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685450	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685451	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Majadahonda, Madrid	KP685452	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Escarabajosa de Cabezas, Segovia	KP685453	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Escarabajosa de Cabezas, Segovia	KP685454	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Escarabajosa de Cabezas, Segovia	KP685455	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Escarabajosa de Cabezas, Segovia	KP685456	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Escarabajosa de Cabezas, Segovia	KP685457	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Escarabajosa de Cabezas, Segovia	KP685458	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Escarabajosa de Cabezas, Segovia	KP685459	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685460	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685461	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685462	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685463	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685464	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685465	En este trabajo	481	26, 455	II
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685466	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685467	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685468	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685469	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685470	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685471	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685472	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685473	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685474	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685475	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685476	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685477	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685478	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685479	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Vicálvaro, Madrid	KP685480	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685481	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685482	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685483	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685484	En este trabajo	481	26, 104, 351	I

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685485	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685486	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685487	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685488	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685489	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685490	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685491	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685492	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685493	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685494	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685495	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685496	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685497	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685498	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685499	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685500	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685501	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685502	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685503	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685504	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685505	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685506	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685507	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685508	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685509	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685510	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685511	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685512	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685513	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685514	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685515	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685516	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685517	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685518	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685519	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Sant Joan de Labritja, Ibiza	KP685520	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685521	En este trabajo	481	26, 104, 351	I

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685522	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685523	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685524	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685525	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685526	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685527	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685528	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685529	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685530	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685531	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685532	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685533	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685534	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685535	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685536	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP685537	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. perniciosus</i>	2013	España: Zaorejas, Guadalajara	KP685538	En este trabajo	481	26, 104, 351	I
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685539	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685540	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685541	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685542	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685543	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685544	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685545	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685546	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685547	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685548	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685549	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. ariasi</i>	2013	España: Agés, Burgos	KP685550	En este trabajo	480	26, 454	IV
1	<i>P. papatasi</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP702248	En este trabajo	472	26, 72, 374	VI
1	<i>P. papatasi</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP702249	En este trabajo	472	26, 72, 374	VI
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Buenache de Alarcón, Cuenca	KP702250	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP702251	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP702252	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP702253	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP702254	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP702255	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP702256	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP702257	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP702258	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP702259	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Castilblanco de los Arroyos, Sevilla	KP702260	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Vicalvaro, Madrid	KP702261	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP702262	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP702263	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
1	<i>S. minuta</i>	2013	España: Moratalla, Murcia	KP702264	En este trabajo	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV
2	<i>P. perniciosus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766954	21635869	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766955	21635869	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766956	21635869	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766957	21635869	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766958	21635869	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Malta?	JN036724	22897038*	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Malta?	JN036725	22897038*	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Malta?	JN036727	22897038*	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Túnez?	JN036728	22897038*	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Portugal: Lisboa	JN036729	22897038	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Portugal: Lisboa?	JN036730	22897038*	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Portugal: Lisboa?	JN036731	22897038*	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Portugal: Lisboa?	JN036732	22897038*	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Portugal: Lisboa?	JN036733	22897038*	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Portugal: Lisboa?	JN036734	22897038*	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	España: Orgiva, Granada	JN036735	22897038	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Italia: Gargano, Foggia	JN036737	22897038	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Túnez: Mahdia	JN036738	22897038	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Túnez: Monastir	JN036742	22897038	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Túnez: Mahdia?	JN036743	22897038*	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Túnez: Tataouine	JN036744	22897038	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Túnez: Tataouine	JN036745	22897038	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Túnez: Tataouine	JN036748	22897038	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Túnez: Tataouine	JN036754	22897038	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	2011-s	Túnez: Tataouine	JN036755	22897038	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. perniciosus</i>	1997-s	Italia, Malta, Túnez	U94472	9272439	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. longicuspis</i>	2010-s	Morocco:	HM131126	20451525	481	26, 104, 351	I
2	<i>P. longicuspis</i>	2011-s	Túnez: Tataouine	JN036757	22897038	481	26, 90, 104, 261	III

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
2	<i>P. longicuspis</i>	2011-s	Túnez: Monastir	JN036758	22897038	481	26, 90, 104, 261	III
2	<i>P. longicuspis</i>	2011-s	Túnez: Monastir	JN036759	22897038	481	26, 90, 104, 261	III
2	<i>P. longicuspis</i>	2011-s	Túnez: Monastir?	JN036760	22897038*	481	26, 90, 104, 261	III
2	<i>P. longicuspis</i>	2011-s	Túnez: Monastir	JN036761	22897038	481	26, 90, 104, 261	III
2	<i>P. ariasi</i>	2002, 2003	España: Andalucía	HM131081	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2002	España: Sant Jaume de Llierca, Girona	HM131082	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2003	España: Benamahoma, Cádiz	HM131083	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2003	España: Benamahoma, Cádiz	HM131084	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2002	España: Trévez, Granada	HM131085	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1997	Portugal: Nagozelo do Douro, São João da Pesqueira	HM131086	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1997	Portugal: Nagozelo do Douro, São João da Pesqueira	HM131087	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1997	Portugal: Nagozelo do Douro, São João da Pesqueira	HM131088	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1997	Portugal: Nagozelo do Douro, São João da Pesqueira	HM131089	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1989, 1992, 2008, 2009	Portugal:	HM131090	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2002	España: Sant Jaume de Llierca, Girona	HM131091	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1995	España: Aracena, Huelva	HM131092	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Madrid	HM131093	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Paredes de Buitrago, Madrid	HM131094	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Madrid	HM131095	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Paredes de Buitrago, Madrid	HM131096	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: (several sites), Madrid	HM131097	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Santa María de la Alameda, Madrid	HM131098	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1995	España: Río Tinto, Huelva	HM131099	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2007	Francia: Sumène, Gard	HM131100	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2007	Francia: Sumène, Gard	HM131101	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2002, 2008	España: (several sites)	HM131102	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1998	Francia: Roquebrune, Hérault	HM131103	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1998	Francia: L' Aumède, Gard	HM131104	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1998	Francia: Mas-Saint-Loup, Gard	HM131105	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1998, 2007	Francia: (several sites)	HM131106	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Gualchos, Granada	HM131107	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1992	Portugal: Freixo de Espada à Cinta, Braganza	HM131108	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2007	Francia: La Valentine, Bouches du Rhône	HM131109	20451525	480	26, 454	IV

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
2	<i>P. ariasi</i>	1998	Francia: Roquebrune, Hérault	HM131110	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1998	Francia: Mas-Saint-Loup, Gard	HM131111	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1998	Francia: L' Aumède, Gard	HM131112	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2002	España: Valdemalmusa, Huelva	HM131113	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Santa María de la Alameda, Madrid	HM131114	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2002	España: Sant Jaume de Llierca, Girona	HM131115	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2002, 2003, 2006, 2008	España: (several sites)	HM131116	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Güejar Sierra, Granada	HM131117	20451525	480	26, 178, 276	V
2	<i>P. ariasi</i>	2006	España: Busquistar, Granada	HM131118	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2002	España: Cástaras, Granada	HM131119	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Gualchos, Granada	HM131120	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1992	Portugal: Freixo de Espada à Cinta, Braganza	HM131121	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Las Sabinas, Granada	HM131122	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2008	España: Hoya Pedraza, Granada	HM131123	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	1992	Portugal: Freixo de Espada à Cinta, Braganza	HM131124	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. ariasi</i>	2007	Argelia: Aurès	HM131125	20451525	480	26, 454	IV
2	<i>P. papatasi</i>	2001	Irán: Khorzoogh, Isfahan	AY378318	14651648	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Egipto: Kafr ash shaykh	DQ381816	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Egipto: Alexandria	DQ381817	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Egipto:	DQ381818	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Egipto?:	DQ381819	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Egipto?:	DQ381820	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2003	Israel: Jordan Valley	DQ381821	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2003	Israel: Jordan Valley	DQ381822	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2003	Israel: Jordan Valley	DQ381823	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Palestina:	DQ381824	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Palestina:	DQ381826	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Palestina:	DQ381827	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Jordania:	DQ381828	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Italia:	DQ381829	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Italia:	DQ381830	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Italia:	DQ381831	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Siria:	DQ381832	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Siria:	DQ381833	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Turquía:	DQ381834	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Turquía:	DQ381835	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2007	Afganistán: Feyzabad, Badakhshan	HM803194	21396252	472	26, 72, 374	VI

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
2	<i>P. papatasi</i>	2009	Afganistán: Kondo, Kondo	HM803210	21396252	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2009	Afganistán: Ghowrmach, Badghis	HM803211	21396252	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2009	Afganistán: Mazar-e Sharif, Balkh	HM803212	21396252	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2009	Italia: Bari	HM992926	20738865	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2009	Italia: Bari	HM992927	20738865	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766973	21635869	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766974	21635869	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766975	21635869	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	1997-s	Chipre, Túnez:	U94475	9272439	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. papatasi</i>	2006-s	Chipre, Túnez, Siria:	DQ381815	17897368	472	26, 72, 374	VI
2	<i>P. chabaudi</i>	2013-s	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	KC433541	25171607	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2013-s	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	KC433542	25171607	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2013-s	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	KC433543	25171607	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2013-s	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	KC433544	25171607	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2013-s	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	KC433545	25171607	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2013-s	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	KC433546	25171607	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2013-s	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	KC433548	25171607	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2013-s	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	KC433547	25171607	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Moknine, Monastir	EU935814	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Sidi Ameur, Monastir	EU935806	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Sidi Ameur, Monastir	EU935807	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2004	Túnez: Souassi, Mahdia	EU935796	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Sayada, Monastir	EU935798	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Sayada, Monastir	EU935799	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Sayada, Monastir	EU935800	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Skanes, Monastir	EU935801	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Skanes, Monastir	EU935802	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Skanes, Monastir	EU935803	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Sidi Ameur, Monastir	EU935808	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Sidi Ameur, Monastir	EU935809	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: M. Kamel, Monastir	EU935810	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Benbla, Monastir	EU935811	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Moknine, Monastir	EU935812	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Moknine, Monastir	EU935813	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2006	Argelia: Menaa, Aurès	EU935791	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2007	Argelia: Menaa, Aurès	EU935792	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2007	Argelia: Menaa, Aurès	EU935793	19202763	472	26, 446	VII

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
2	<i>P. chabaudi</i>	2007	Argelia: Ain-Zaatout, Aurès	EU935794	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Teboulba, Monastir	EU935805	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2005	Túnez: Teboulba, Monastir	EU935804	19202763	472	26, 57, 389	VIII
2	<i>P. chabaudi</i>	2004	Túnez: Souassi, Mahdia	EU935797	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. chabaudi</i>	2007	Argelia: Ain-Zaatout, Aurès	EU935795	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. neglectus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766959	21635869	491	26, 465	IX
2	<i>P. neglectus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766960	21635869	491	26, 465	IX
2	<i>P. neglectus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766961	21635869	491	26, 465	IX
2	<i>P. neglectus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766963	21635869	491	26, 465	IX
2	<i>P. neglectus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766964	21635869	491	26, 465	IX
2	<i>P. neglectus</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766962	21635869	491	26, 465	IX
2	<i>P. perfiliewi</i>	2011-s	Italia: Matera	JF766965	21635869	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2011-s	Italia: Matera	JF766966	21635869	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2011-s	Italia: Matera	JF766967	21635869	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2011-s	Italia: Matera	JF766968	21635869	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2011-s	Italia: Matera	JF766969	21635869	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2011-s	Italia: Matera	JF766970	21635869	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2011-s	Italia: Matera	JF766971	21635869	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2011-s	Italia: Matera	JF766972	21635869	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Grecia: Macedonia	KF680806	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Grecia: Macedonia	KF680807	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Grecia: Macedonia	KF680808	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Grecia: Macedonia	KF680809	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Italia: Continental	KF680810	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Italia: Continental	KF680811	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Italia: Continental	KF680812	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Italia: Continental	KF680813	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Italia: Continental	KF680814	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Italia: Sardinia	KF680815	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Italia: Sardinia	KF680816	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Italia: Sardinia	KF680817	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Italia: Sardinia	KF680818	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Argelia:	KF680819	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Argelia:	KF680820	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Argelia:	KF680821	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	2013-s	Argelia:	KF680822	24140558	480	26, 90, 104, 260	X
2	<i>P. perfiliewi</i>	1997-s	Greece: Corfu	U94477	9272439	480	26, 90, 104, 260	X

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
2	<i>P. riouxi</i>	2006	Argelia: Ghardaïa, Ghardaïa	EU935815	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2006	Argelia: Ghardaïa, Ghardaïa	EU935816	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2006	Argelia: Ghardaïa, Ghardaïa	EU935817	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2006	Argelia: Metlili, Ghardaïa	EU935818	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2006	Argelia: Metlili, Ghardaïa	EU935819	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2006	Argelia: Metlili, Ghardaïa	EU935820	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2006	Argelia: Metlili, Ghardaïa	EU935821	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2006	Argelia: Metlili, Ghardaïa	EU935822	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2006	Argelia: Metlili, Ghardaïa	EU935823	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2007	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	EU935824	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2007	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	EU935825	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2007	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	EU935826	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. riouxi</i>	2007	Túnez: Ghomrassen, Tataouine	EU935827	19202763	472	26, 446	VII
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Kerman, Kerman	DQ840374	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bam, Kerman	DQ840377	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2011-s	Túnez: Tataouine	JN036762	22897038	476	26, 206, 244	XII
2	<i>P. sergenti</i>	2011-s	Túnez: Tataouine	JN036764	22897038	476	26, 206, 244	XII
2	<i>P. sergenti</i>	2013-s	Túnez:	KF668645	Unpublished	476	26, 206, 244	XII
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Sabzevar, Khorassan	DQ840348	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Sabzevar, Khorassan	DQ840349	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Sabzevar, Khorassan	DQ840350	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Sabzevar, Khorassan	DQ840351	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Neishabur, Khorassan	DQ840352	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Neishabur, Khorassan	DQ840353	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Neishabur, Khorassan	DQ840354	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003, 2004	Irán: Tabriz, Eastern-Azerbaijan	DQ840357	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003, 2004	Irán: Tabriz, Eastern-Azerbaijan	DQ840358	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003, 2004	Irán: Tabriz, Eastern-Azerbaijan	DQ840359	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003, 2004	Irán: Tabriz, Eastern-Azerbaijan	DQ840360	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2004	Irán: Meshgin-Shahr, Ardebil	DQ840361	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2004	Irán: Meshgin-Shahr, Ardebil	DQ840362	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003, 2005	Irán: Tehran, Tehran	DQ840363	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003, 2005	Irán: Tehran, Tehran	DQ840364	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003, 2005	Irán: Tehran, Tehran	DQ840365	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003, 2005	Irán: Tehran, Tehran	DQ840366	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003, 2005	Irán: Tehran, Tehran	DQ840367	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Kerman, Kerman	DQ840368	17451632	476	26, 450	XI

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Kerman, Kerman	DQ840369	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Kerman, Kerman	DQ840370	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Kerman, Kerman	DQ840371	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Kerman, Kerman	DQ840372	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Kerman, Kerman	DQ840373	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bam, Kerman	DQ840375	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bam, Kerman	DQ840376	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bam, Kerman	DQ840378	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bam, Kerman	DQ840379	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Yazd, Yazd	DQ840380	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Yazd, Yazd	DQ840381	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Yazd, Yazd	DQ840382	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Yazd, Yazd	DQ840383	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Izeh, Khuzistan	DQ840384	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Izeh, Khuzistan	DQ840385	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Izeh, Khuzistan	DQ840386	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003	Irán: Shiraz, Fars	DQ840387	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003	Irán: Shiraz, Fars	DQ840388	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bushehr	DQ840389	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bushehr	DQ840390	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bushehr	DQ840391	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bushehr	DQ840392	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bushehr	DQ840393	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bandar-Abbas, Hormozgan	DQ840394	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2005	Irán: Bandar-Abbas, Hormozgan	DQ840395	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2003	Irán: Angoori, Sistan & Baluchistan	DQ840396	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2006-s	Grecia:	DQ840398	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2006-s	Siria:	DQ840401	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2006-s	Libano:	DQ840402	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2006-s	Turquía:	DQ840403	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i>	2006-s	Marruecos:	DQ840404	17451632	476	26, 206, 244	XII
2	<i>P. sergenti</i>	2004	Irán: Tabriz, Eastern-Azerbaijan	DQ840405	17451632	476	26, 450	XI
2	<i>P. sergenti</i> ^A	2011-s	Túnez: Tataouine	JN036763	22897038	476	26, 206, 244	XII
2	<i>P. chadlii</i>	2010-s	Argelia: Aurès	HM131080	20451525	477	26, 451	XIII
2	<i>P. chadlii</i>	2010-s	Argelia: Aurès	HM131079	20451525	477	26, 451	XIII
2	<i>P. balcanicus</i>	2012-s	Irán?:	JX885989	No publicado	472	26, 446	VII
2	<i>P. balcanicus</i>	2012-s	Irán ?:	JX885983	No publicado	472	26, 446	VII

Anexo 5. Continuación. Información sobre los especímenes y secuencias de ADN incluidos

Panel	Especies	Año	Localidad (País: Provincia, o Región)	No. Acceso GenBank	Referencia**	cytb-nd1 PCR (pb)	Bandas de Restricción (pb)	Patrón Ase I RFLP
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Neishabur, Khorassan-e-Razavi	EF017370	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Isfahan, Isfahan	EF017353	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Isfahan, Isfahan	EF017354	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Urmia, Western-Azerbaijan	EF017357	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2004	Irán: MeshKin-shahr, Ardebil	EF017359	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Isfahan, Isfahan	EF017361	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Isfahan, Isfahan	EF017362	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Urmia, Western-Azerbaijan	EF017349	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Yazd, Yazd	EF017371	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Sabzevar, Khorassan-e-Razavi	EF017369	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Tabriz, Eastern-Azerbaijan	EF017368	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Yazd, Yazd	EF017367	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Yazd, Yazd	EF017358	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Kerman, Kerman	EF017365	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Neishabur, Khorassan-e-Razavi	EF017364	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Sabzevar, Khorassan-e-Razavi	EF017360	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Neishabur, Khorassan-e-Razavi	EF017355	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Neishabur, Khorassan-e-Razavi	EF017363	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Kerman, Kerman	EF017352	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Sabzevar, Khorassan-e-Razavi	EF017351	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2009	Afganistán: Kabul	HM803207	21396252	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2009	Afganistán: Konduz	HM803215	21396252	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2005	Irán: Kerman, Kerman	EF017356	17982863	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2009	Afganistán: MeS	HM803213	21396252	476	26, 214, 236	XIV
2	<i>P. caucasicus</i>	2009	Afganistán: Ghormach	HM803206	21396252	476	26, 450	XI
2	<i>S. minuta</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766976	21635869	482	17, 26, 72, 131, 236	XVI
2	<i>S. minuta</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766977	21635869	482	17, 26, 72, 131, 236	XVI
2	<i>S. minuta</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766978	21635869	482	17, 26, 72, 131, 236	XVI
2	<i>S. minuta</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766979	21635869	482	17, 26, 72, 131, 236	XVI
2	<i>S. minuta</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766980	21635869	482	17, 26, 72, 131, 236	XVI
2	<i>S. minuta</i>	2008, 2009	Italia: Putignano, Bari	JF766981	21635869	482	17, 26, 40, 72, 91, 236	XV

Año-s: indica la fecha en que la secuencia fue sometida al GenBank, en estas secuencias no fue posible identificar con precisión el año de captura del flebotomo

*: Aunque el documento se refiere en los datos GenBank Acc No, no está claro que las secuencias estén relacionadas con la publicación.

?: Indica la ubicación posible en la que el espécimen fue capturado, si bien la información proporcionada en el Genbank o en la publicación asociada no es suficientemente clara.; ** Referencia como PubMed ID Number, a menos que se indique lo contrario

^ *P. longicuspis* en la publicación, pero aparece como *P. sergenti* en GenBank

Anexo 6.

Diferencias nucleotídicas en COI de *P. perniciosus*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

Haplotipos	Posición de los Sitios polimórficos/nucleótidos (SNP)																																																No. Esp.
	1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 4 4 4 4 5 5 5 5 5 6 6 6 6																																																
	1	5	7	8	0	4	3	7	2	5	8	5	3	5	0	5	1	9	5	4	5	8	3	6	3	4	6	5	8	3	6	7	8	4	9	5	9	7	2	5	5	0	5	6	6				
PPERN-1	A	T	T	C	C	C	T	A	T	C	C	A	C	T	A	G	G	C	T	G	A	A	C	G	C	G	G	A	C	C	G	T	C	T	A	C	G	G	C	T	T	C	C	T		73			
PPERN-2	A	.	C	A	.	G	3			
PPERN-3	A	.	C	A	.	G	2				
PPERN-4	T	A	.	C	A	.	G	3				
PPERN-5	A	.	C	A	.	G	T	1				
PPERN-6	T	A	.	C	A	.	G	1				
PPERN-7	T	.	C	C	.	T	G	.	C	.	A	C	A	T	T	C	1				
PPERN-8	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	T	T	2				
PPERN-9	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	C	16				
PPERN-10	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	A	T	T	C	1				
PPERN-11	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	A	.	G	T	T	C	1				
PPERN-12	.	.	C	T	G	.	C	.	A	.	T	.	.	C	A	T	T	C	1			
PPERN-13	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	T	A	T	C	1			
PPERN-14	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	T	.	.	A	T	C	1			
PPERN-15	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	T	T	C	1			
PPERN-16	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	T	T	C	1		
PPERN-17	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	G	T	T	.	.	.	C	1		
PPERN-18	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	T	T	T	.	.	.	C	1		
PPERN-19	.	.	C	.	T	T	G	.	C	.	A	C	A	T	T	C	1		
PPERN-20	.	.	C	G	.	T	G	.	C	.	A	C	A	T	.	.	T	.	.	.	C	1			
PPERN-21	T	1			
PPERN-22	T	1			
PPERN-23	1			
PPERN-24	1			
PPERN-25	T	T	1			
PPERN-26	G	1			
PPERN-27	.	.	C	T	1			
PPERN-28	.	.	C	T	T	36			
PPERN-29	.	.	C	T	T	G	1			
PPERN-30	.	.	C	T	T	G	2				
PPERN-31	.	.	C	T	T	2				
PPERN-32	.	.	C	T	T	1				
PPERN-33	.	.	C	T	T	1				
PPERN-34	.	.	C	T	T	1				
PPERN-35	.	.	C	T	T	.	T	1				
PPERN-36	.	.	C	T	T	T	1				
PPERN-37	.	.	C	T	T	1				
PPERN-38	.	.	C	T	T	1				
PPERN-39	.	.	C	T	G	.	C	.	A	C	A	T	.	.	T	C	1			

Diferencias nucleotídicas en COI de *P. longicuspis*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

[illegible]

Anexo 6.

Diferencias nucleotídicas en la COI de *P. ariasi*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

		Posición de los Sitios polimórficos/nucleótidos (SNP) +38																																															
		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 4 4 5 5 5 5 5 5 5 5 6 6																																															
Haplotipos	7	2	3	5	6	6	9	0	0	0	2	2	3	3	4	4	6	8	8	9	0	6	7	9	1	2	4	5	5	6	6	2	3	3	3	8	9	9	2	3	5	5	7	8	9	9	0	1	N
PARIA-1	C	G	G	A	A	G	A	A	T	A	T	T	A	T	T	G	T	A	T	A	C	A	A	G	A	C	C	G	T	A	A	T	G	G	T	G	T	A	G	G	A	C	A	G	T	T	G	3	
PARIA-2	T	A	A	T	G	A	G	T	C	G	C	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	2
PARIA-3	T	A	A	T	G	A	G	T	C	G	C	C	G	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	1	
PARIA-4	T	A	A	T	G	A	G	T	C	G	C	C	G	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	8	
PARIA-5	T	A	A	T	G	A	G	T	C	G	C	C	G	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	1	

Diferencias nucleotídicas en la COI de *P. papatasi*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

Haplotipos	Posición de los Sitios polimórficos/nucleótidos (SNP) +38																							No. Esp.
	15	73	6	9	2	0	6	5	8	7	2	5	0	6	2	6	2	7	0	7	3			
PPAPA-1	C	C	T	T	C	G	T	C	A	A	G	C	C	C	A	G	C	A	T	G		1		
PPAPA-2			C															T	G	C		1		
PPAPA-4	G																			C		1		
PPAPA-6				G		T		C							T					C		1		
PPAPA-3			C								A							T		C	C	1		
PPAPA-7		T	C			A									T					C		1		
PPAPA-5	G	T	C			A									T					C		1		
PPAPA-8		T				A		T							T		A			C		1		
PPAPA-9				C	T	A						T	T							C		1		
PPAPA-10				C						G	G					G				C		2		

Diferencias nucleotídicas en la COI de *P. sergenti*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

	Posición de los Sitios polimórficos/nucleótidos (SNP) +38																																						No. Esp.						
Haplotipos	1	2	3	4	7	9	0	0	2	3	5	0	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	6	6									
	1	5	1	2	3	6	2	6	1	8	3	5	0	6	5	8	9	2	8	4	7	4	0	6	3	5	5	3	6	5	8	1	6	1	6	8	0	6	9	4	4	8	0	0	
PSERG-1	A	A	G	G	T	A	G	A	C	G	A	C	G	C	G	A	A	G	G	G	C	C	T	C	G	A	A	G	A	G	T	G	G	G	C	C	G	G	A	A	C	T	1		
PSERG-2													T			A				A		T	T		G																			2	
PSERG-3	C	G	A	A	C	G	A	G	T	A	G			A	T	A	G	G	T	A	A	T	T	C	A	A	G	G	C	G	A	C	A	A	A	T	T	A	A	A	G	G	T	C	1

Diferencias nucleotídicas en la COI en *P. perfiliewi*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

Haplotipos	Posición de los Sitios polimórficos/nucleótidos (SNP) +38				No. Esp.
	3	2	2	5	
PPERF-1	A	A	A	T	3
PPERF-2	.	.	.	C	1
PPERF-3	G	G	G	.	1

Anexo 6.

Diferencias nucleotídicas en la COI en *P. alexandri*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

Haplotipos	Posición de los Sitios polimórficos/nucleótidos (SNP) +38																No. Esp.
	6	9	1	1	2	2	3	3	3	3	4	5	5	5	6		
	4	7	0	9	5	6	0	0	1	7	8	2	9	8	4		
PALEX-1	A	A	G	T	T	T	T	A	G	T	T	G	T	T	T		1
PALEX-2	.	.	A	C	C	.	.	T	.	.	C	A	.	.	.		1
PALEX-3	.	.	A	C	C	C	A	.	C	.		1
PALEX-4	.	.	A	C	C	C	A	.	.	.		2
PALEX-5	T	.	A	C	C	C	A	.	.	.		3
PALEX-6	.	.	A	C	C	C	A	G	.	.		1
PALEX-7	T	.	.	C	C	C	A	.	.	.		1
PALEX-8	.	.	A	.	C	.	C	.	.	.	C	A	.	.	.		1
PALEX-9	.	.	A	C	C	.	.	.	A	.	.	A	.	.	.		1
PALEX-10	.	.	A	C	C	C	C	A	.	.	.		1
PALEX-11	.	.	A	C	C	C	.	.	.	C	C	A	.	.	C		1
PALEX-12	.	G	A	C	C	C	A	.	.	.		1

Diferencias nucleotídicas en la COI en *P. chadlii*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

Haplotipos	Sitios polimórficos/nucleótidos (SNP) +38		No. Esp.
	5	3	
	2	1	
PCHAD-1	T	T	1
PCHAD-2	C	C	1

Diferencias nucleotídicas en la COI en *P. riouxi*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

Haplotipos	Sitios polimórficos/nucleótidos (SNP) +38		No. Esp.
	4	5	
	1	8	
	8	9	
PRIOU-1	G	G	2
PRIOU-2	A	A	1

Diferencias nucleotídicas en la COI en *P. chabaudi*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

Haplotipos	SNP		No. Esp.
	4	0	
	6		
PCHAB-1	G		3
PCHAB-2	A		1

Diferencias nucleotídicas en la COI en *S. minuta*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

Diferencias nucleotídicas en la COI en ***S. antennata***. Los números de la segunda fila representan la posición del nucléotido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

Diferencias nucleotídicas en la COI en *S. fallax*. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

Diferencias nucleotídicas en la COI en ***S. clydei***. Los números de la segunda fila representan la posición del nucleótido en la secuencia. Transición C/T o A/G y Transversión: C/G o A/T, remarcadas en rojo. A la derecha el número total de secuencias por haplotipo.

- 301 -

Publicaciones

El desarrollo de esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Artículos de Investigación:

1. **Llanes-Acevedo I. P.**, Arcones C., Gálvez R., Martín O., Checa R., Montoya A., Chicharro C., Cruz S., Miro G., Cruz I. "DNA sequence analysis suggests that *cytb-nd1* PCR-RFLP may not be applicable to sandfly species identification throughout the Mediterranean region". *Parasitol Res.* 2016 Mar; 115(3):1287-95. doi: 10.1007/s00436-015-4865-5. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26755361. A. IF: 2.1
2. Chicharro C, **Llanes-Acevedo I.P.**, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. "Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012". *Euro Surveill.* 2013; 18: 65-77. PMID: 23929179. A. IF: 5.49

Capítulos de Libro:

1. Bangert M., **Llanes-Acevedo I.P.**, Cruz S., Cruz I. 2017. Importancia de la caracterización molecular en un sistema de vigilancia de la leishmaniasis. En Vilas F (coord.). "*Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: el papel de las liebres y los conejos como reservorios*". Dirección General de Salud Pública. Comunidad de Madrid.
2. **Llanes- Acevedo I.P.**, Cruz I., Albertini A., Rivas L. 2015. Leishmaniasis. En Rodríguez y Rubio (coords.). "*Diagnóstico de las enfermedades desatendidas: moléculas y trópico*". Grupo Editorial. Sial Pigmalión, S.L, v., p.48-67.

Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012

C Chicharro¹, I P Llanes-Acevedo¹, E García¹, J Nieto¹, J Moreno¹, I Cruz (cruzi@isciii.es)¹

1. WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Citation style for this article:

Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. Euro Surveill. 2013;18(30):pii=20545. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20545>

Article submitted on 24 August 2012 / published on 25 July 2013

Leishmaniasis is endemic in south-west Europe. Recent data point to the spread and (re-)emergence of this disease in previously endemic and non-endemic European countries. A recent example is the urban community outbreak of cutaneous and visceral leishmaniasis in the south-west of Madrid autonomous community, Spain, which began on 1 July 2009. A total of 446 cases associated to this outbreak were reported up to 31 December 2012. We show molecular typing data for 73 *Leishmania infantum* isolates obtained from January 2008 to July 2012 from different areas of Madrid, including those affected by the outbreak. Seven different genotypes were identified by combining data from two targets: the ribosomal internal transcribed spacers (ITS)-1 and -2 and the *haspb* (*k26*) gene. The results contribute to a better understanding of the parasite population circulating in the region, and indicate that most of the outbreak-associated isolates (22/31) were infected by parasites with the same combined genotype. Additional data from 82 *L. infantum* isolates typed as either *MON-1* or *MON-24* by isoenzyme analysis indicate that far from concluding that the outbreak was caused by a 'new' emerging genotype, further molecular typing-based surveillance studies are required to better understand the epidemiology of leishmaniasis in the region.

Introduction

Leishmania infantum is the causative agent of autochthonous cutaneous and visceral cases of leishmaniasis in Spain, and female sandflies of the species *Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi* are responsible of its transmission; this depends on a zoonotic cycle, in which dogs are considered the main reservoir hosts [1]. However, reports on *Leishmania* infection in other animals from Spain, such as wild carnivores, captive macropods, rabbits and hares, are increasing in number [2-5]. Although, their role in transmission to humans has yet to be elucidated, *L. infantum* transmission from naturally infected hares to *P. perniciosus* sandflies has been recently proven [5].

In Spain, leishmaniasis is considered a hypoendemic disease (0.41 cases per 100,000 inhabitants in 2012)

[1]. However, figures for both visceral (VL) and particularly cutaneous leishmaniasis (CL) are underestimates, due to the absence of a centralised surveillance system and because leishmaniasis is not a mandatorily notifiable disease in all autonomous communities of the country [1]. After the first description of a case of acquired immune deficiency syndrome (AIDS)-associated leishmaniasis in 1985 [6], Spain faced a re-emergence of leishmaniasis related to the spread of the human immunodeficiency virus (HIV). Of the 1,911 cases of coinfection reported from south-west Europe to the World Health Organization (WHO) between 1990 and 2001, Spain accounted for 1,099 of them [7]. Fortunately, the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) therapy in the late 1990s contributed to a marked decrease of coinfection cases in south-west Europe: 299 cases were reported to WHO, 130 of which were from Spain, between 2001 and 2006 [8].

In spite of the worrying *Leishmania*/HIV coinfection phenomenon, leishmaniasis seems to have been under control in south-west Europe. Nevertheless, attention has been recently been drawn to the probable spread/re-emergence of leishmaniasis in Europe, including discussion of the contributing factors [9,10]. At the same time, examples appeared, such as the northward spread of human and canine leishmaniasis in Italy (in 2003) [11,12] and canine leishmaniasis in Spain (in 2011) [13], and endemic transmission of *L. infantum* to dogs in Hungary (in 2007), which until then had been regarded as free of leishmaniasis [14,15].

An urban community outbreak of CL and VL in the south-west of Madrid autonomous community (hereafter referred to as Madrid), Spain, provides a further example [16]. In Madrid, leishmaniasis surveillance has been carried out through a reporting system of mandatorily notifiable diseases since 1997, with regular records of 12 to 25 leishmaniasis cases per year [16]. However, in the last quarter of year 2010, a marked increase in the number of reported cases was noticed; subsequent investigation indicated that the outbreak had started on 1 July 2009 in the south-west of the

DNA sequence analysis suggests that *cytb-nd1* PCR-RFLP may not be applicable to sandfly species identification throughout the Mediterranean region

Ivonne Pamela Llanes-Acevedo¹ · Carolina Arcones¹ · Rosa Gálvez² · Oihane Martin² · Rocío Checa² · Ana Montoya² · Carmen Chicharro¹ · Susana Cruz¹ · Guadalupe Miró² · Israel Cruz³

Received: 13 October 2015 / Accepted: 30 November 2015 / Published online: 12 January 2016
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Molecular methods are increasingly used for both species identification of sandflies and assessment of their population structure. In general, they are based on DNA sequence analysis of targets previously amplified by PCR. However, this approach requires access to DNA sequence facilities, and in some circumstances, it is time-consuming. Though DNA sequencing provides the most reliable information, other downstream PCR applications are explored to assist in species identification. Thus, it has been recently proposed that the amplification of a DNA region encompassing partially both the *cytochrome-B* (*cytb*) and the *NADH dehydrogenase 1* (*nd1*) genes followed by RFLP analysis with the restriction enzyme *Ase I* allows the rapid identification of the most prevalent species of phlebotomine sandflies in the Mediterranean region. In order to confirm the suitability of this method, we

collected, processed, and molecularly analyzed a total of 155 sandflies belonging to four species including *Phlebotomus ariasi*, *P. papatasi*, *P. perniciosus*, and *Sergentomyia minuta* from different regions in Spain. This data set was completed with DNA sequences available at the GenBank for species prevalent in the Mediterranean basin and the Middle East. Additionally, DNA sequences from 13 different phlebotomine species (*P. ariasi*, *P. balcanicus*, *P. caucasicus*, *P. chabaudi*, *P. chadlii*, *P. longicuspis*, *P. neglectus*, *P. papatasi*, *P. perfiliewi*, *P. perniciosus*, *P. riouxi*, *P. sergenti*, and *S. minuta*), from 19 countries, were added to the data set. Overall, our molecular data revealed that this PCR-RFLP method does not provide a unique and specific profile for each phlebotomine species tested. Intraspecific variability and similar RFLP patterns were frequently observed among the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00436-015-4865-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ivonne Pamela Llanes-Acevedo
pamellanes@isciii.es

Carolina Arcones
c.arcones@isciii.es

Rosa Gálvez
r.galvez@ucm.es

Oihane Martin
oihane.martin.s@gmail.com

Rocío Checa
rocichec@ucm.es

Ana Montoya
amontoya@ucm.es

Carmen Chicharro
cchichar@isciii.es

Susana Cruz
susi_11@hotmail.com

Guadalupe Miró
gmiro@ucm.es

Israel Cruz
isra.cruz@finddx.org

¹ Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, World Health Organization Collaborating Center for Leishmaniasis, Ctra. Majadahonda-Pozuelo Km2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

² Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

³ Neglected Tropical Diseases Programme, Foundation for Innovative New Diagnostics-FIND, Chemin des Mines 9, Campus Biotech, 1202 Geneva, Switzerland